



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

A densidade e a variação sazonal de flebótomos (Diptera, Psychodidae), vetores de *Leishmania*, em área urbana da região de Lisboa: repercussões na transmissão vetorial

Stephanie Nunes Gouveia

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM PARASITOLOGIA
MÉDICA

FEVEREIRO, 2017



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

A densidade e a variação sazonal de flebótomos (Diptera, Psychodidae), vetores de *Leishmania*, em área urbana da região de Lisboa: repercussões na transmissão vetorial

Autora: Stephanie Nunes Gouveia

Orientadora: Professora Doutora Maria Odete Afonso

Coorientadora: Professora Doutora Carla Maia

Dissertação apresentada para o cumprimento dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre em Parasitologia Médica

Stephanie Nunes Gouveia

A densidade e a variação sazonal de flebótomos (Diptera, Psychodidae), vetores de *Leishmania*,
em área urbana da região de Lisboa: repercussões na transmissão vetorial

2017



“Nunca deixe de tentar”

Michael Jordan

AGRADECIMENTOS

O espaço limitado desta secção de agradecimentos, não me permite agradecer, como devia, a todas as pessoas que, ao longo do meu Mestrado em Parasitologia Médica, IHMT, UNL, me ajudaram, direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais esta etapa da minha formação académica. A todos, deixo aqui os meus sinceros agradecimentos.

À minha Orientadora, Professora Doutora Maria Odete Afonso, UEI Parasitologia Médica, *GHTM*, IHMT, UNL, pela sua empatia, disponibilidade (até nas férias), atenção dispensada, paciência, dedicação e profissionalismo. Por nunca desistir de mim nas alturas menos boas, e pela sua energia e boa disposição contagiante. Todos os seus ensinamentos contribuíram para o meu crescimento, pois é um exemplo de uma excelente profissional e de um extraordinário ser humano. Não tenho palavras para descrever a minha gratidão...Muito Obrigada!

À minha Co-orientadora, Professora Doutora Carla Maia, UEI Parasitologia Médica, *GHTM*, IHMT, UNL, os meus agradecimentos, pelo auxílio e disponibilidade na realização das técnicas de Biologia Molecular e por todos os conhecimentos transmitidos sobre *Leishmania*.

À Doutora Hilda Hernández Alvarez, Investigadora do Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Havana, Cuba, pela sua total disponibilidade, pelos ensinamentos das técnicas de Biologia Molecular, aquando realizámos as mesmas, pelo apoio gráfico, pela sua compreensão, paciência e dedicação ao longo de todo o seu período de estágio Pós-doc, com a minha Orientadora, o qual influenciou, em muito, a minha formação, não só a nível curricular, como pessoal e emocional.

Às Doutoradas Sónia Faria e Sara Faria, proprietárias da Estação flebotomínica de Alcântara, pela disponibilidade, apoio, companhia e por todas as conversas nas colocações e recolhas das armadilhas CDC. Sem a permissão e ajuda das referidas

proprietárias, a quem já considero Amigas, não teria sido possível realizar este trabalho. Muito e muito Obrigada.

Ao José Manuel Cristóvão, UEI Parasitologia Médica, *GHTM*, IHMT, UNL, pelo auxílio e ensinamento na realização das técnicas laboratoriais moleculares, pela sua empatia, disponibilidade e paciência para as minhas “perguntas existenciais”.

Ao Professor Doutor Paulo Almeida, UEI Parasitologia Médica, *GHTM*, IHMT, UNL, por todo o apoio, e ensino prestado no registo fotográfico das espermatecas flebotómicas, com o programa *Analysis getIT*.

Ao André Pereira, pela disponibilidade e auxílio no registo fotográfico dos ectoparasitas em *Phlebotomus perniciosus*.

À Sofia Branco, que muito me ajudou na análise estatística realizada neste trabalho.

A todos os Professores do XIII Mestrado de Parasitologia Médica, e ao Coordenador/a, os meus agradecimentos pelos ensinamentos transmitidos.

À minha Colega de Mestrado Rosa Miguel, pelo apoio e compreensão demonstrado ao longo de todo este percurso. Pela amizade, companheirismo e ajuda. Agradeço a partilha de bons momentos e os estímulos nas alturas de desânimo. Aos meus Colegas de Curso, por todos os momentos que partilhámos.

Aos meus Pais, aos meus Avós, ao meu Irmão e aos meus Amigos, pelo carinho, apoio, respeito pelas minhas decisões e por me motivarem a querer ir mais longe. Agradeço em especial à minha Mãe, que me compreendeu e apoiou nas alturas mais difíceis.

RESUMO

Portugal é um país endémico de leishmaniose humana (visceral e cutânea) e canina. As espécies flebotomínicas comprovadamente vetoras de *Leishmania infantum* são *Phlebotomus perniciosus* e *P. ariasi*, e o principal reservatório é o cão. Embora sejam conhecidos vários focos desta zoonose, existem regiões onde nunca se efetuaram estudos referentes aos vetores, ou foram prospetadas há várias décadas.

Sendo Lisboa uma região endémica de leishmaniose, e tendo em conta que a fauna flebotomínica foi estudada pelo Professor Fraga de Azevedo há mais de 70 anos, este trabalho teve como principal objetivo determinar a atual composição flebotomínica, numa Estação em Alcântara, representativa de uma área urbana, com boas condições socioeconómicas, mas com características bioecológicas favoráveis à presença de diferentes espécies flebotomínicas.

De maio a novembro de 2015, durante 3 a 4 noites consecutivas, por semana, capturaram-se, por armadilha luminosa CDC, em biótopos domésticos e peridomésticos, 459 flebótomos, de ambos os sexos, pertencentes a dois géneros e a quatro espécies, das cinco assinaladas no País.

Os exemplares capturados foram identificados morfológicamente e a abundância relativa das espécies foi: *P. perniciosus* 52,1% (239/459), *P. ariasi* 32,9 % (151/459), *P. sergenti* 14,6% (67/459) e *Sergentomyia minuta* 0,4% (2/459). Determinou-se a razão dos sexos, o número de fêmeas grávidas e ingurgitadas, a percentagem de flebotomíneos machos com a genitália externa parcial ou totalmente não rodada, a taxa de infestação por ectoparasitas, a taxa de infeção por endoparasitas não *Leishmania* e a relação tipo e variedades de biótopos e espécies flebotomínicas presentes.

Quanto à densidade flebotomínica (nº de flebótomos capturados por armadilha, noite), por espécie e por meses de captura, verificou-se uma tendência bifásica, em que as densidades flebotomínicas totais foram mais elevadas em junho (1º pico) e em setembro (2º pico). Em relação à influência das fases lunares nas densidades, o mês de agosto foi o que apresentou maior diferença na fase de Lua Nova.

Da análise de 94 amostras de ADN de flebótomos fêmeas, não se obteve amplificação de ADN de *Leishmania* com nenhum dos pares de *primers* utilizados. A identificação da fonte de alimentação sanguínea, por PCR, foi realizada em 17 fêmeas ingurgitadas, das quais 4 alimentaram-se em seres humanos, 8 em galinha, 4 em gato e 1 em coelho.

A presença de *P. perniciosus* e *P. ariasi* com maiores abundâncias relativas e densidades, nesta área urbana, mostra que existe não só risco de transmissão vetorial de *L. infantum*, como também este poderá ser elevado em junho e setembro, uma vez que se verificaram dois picos de eclosão de imagos. Também, neste trabalho, a grande plasticidade trófica do maior vetor, em Portugal, foi demonstrada.

A monitorização desta área, e de outras, deveria ser efetuada, pois verificou-se, que mesmo em áreas urbanas com excelentes condições socioeconómicas, os flebótomos vetores estão presentes e basta haver um cão infetado para que, eventualmente, se desenvolva um microfoco de Leishmaniose, ou mesmo um foco de dimensões mais abrangentes.

Palavras-Chave: flebotomíneos, vetores de *Leishmania*, densidades, refeições sanguíneas, Lisboa

ABSTRACT

Portugal is an endemic country of human and canine leishmaniasis. *Phlebotomus perniciosus* and *P. ariasi* are the proven vectors of *Leishmania infantum*, and the main reservoir is the dog. Although several foci of this zoonosis are known, there are regions where phlebotomine sand flies have never been studied, or were only prospected several decades ago.

Lisbon is an endemic area of leishmaniasis, but the last study regarding the sand fly vectors was carried out by Professor Fraga de Azevedo, 70 years ago. The main objective of the present study was to determine the sand fly species fauna, in an urban area of Lisbon city, in a Phlebotomine Station of Alcântara parish. This Station is representative of an urban area with good socio-economic conditions but also with bioecological characteristics favorable to the presence of different phlebotomine species.

From May to November 2015, during three to four consecutive nights per week, 459 sand flies, of both gender, belonging to two genera and to four species of the five reported in Portugal, were captured by CDC light traps in domestic and peridomestic biotopes. The captured specimens were identified morphologically and the relative abundance of the species was: *P. perniciosus* 52.1% (239/459), *P. ariasi* 32.9 % (151/459), *P. sergenti* 14.6% (67/459) and *Sergentomyia minuta* 0.4% (2/459). It was determined the ratio of the sexes, the number of pregnant and engorged females, the percentage of male sand flies with the external genitalia partially or totally not rotated, the infestation rate by ectoparasites, the infection rate by endoparasites other than *Leishmania* and the relation between the type and variety of biotopes and the phlebotomine species.

Regarding the phlebotomine densities (number of sand flies captured per trap, per night), by species and by months, there was a biphasic tendency, in which the total density was higher in June (1st peak) and in September (2nd peak). As for the influence of the lunar phases in the total phlebotomine density, August presented the major difference in the new moon phase.

Leishmania DNA was not detected by PCR in any of the 94 females. The identification of the blood-meal sources, by PCR, was conducted in 17 engorged females, of which four fed on humans, eight on chicken, four on cats and one on a rabbit.

The presence of *P. perniciosus* and *P. ariasi*, with higher relative abundances and densities, in this urban area of Lisbon city, shows that there is not only the risk of vectorial transmission of *L. infantum*, but also that this risk can be higher in June and September, since it was observed two peaks of emerged adults. The results also demonstrated the great trophic plasticity of *P. perniciosus*.

The monitoring of this and other areas should be performed, as it was found that even in an urban area with excellent socio-economic conditions, sand flies vectors can be present and just an infected dog, eventually, is sufficient to develop *Leishmania* microfocus, or even a focus with broader dimensions.

Keywords: phlebotomine sand flies, *Leishmania* vectors, densities, blood-meals, Lisbon

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
Índice de Figuras	xiii
Índice de Quadros	xvii
Lista de Abreviaturas e Siglas	xviii
 1 - Introdução	 1
1.1 – Distribuição global das leishmanioses	1
1.2 – Epidemiologia das leishmanioses	4
1.2.1 – Agente etiológico - <i>Leishmania</i> spp.	4
1.2.2 – Hospedeiros Vertebrados / Reservatórios	6
1.2.3 – Vetores - Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae)	8
1.3 – Leishmanioses em Portugal	10
1.3.1 – Espécies flebotomínicas e distribuição atual	13
1.3.2 – Influência das alterações climáticas e ambientais nas espécies flebotomínicas vetoras	15
1.4 – Posição sistemática dos flebótomos (Diptera, Psychodidae)	18
1.5 – Principais características morfológicas externas dos flebótomos com importância médica e veterinária	20
1.5.1 – Bioecologia e ciclo de vida dos flebótomos	22

1.5.2 – Desenvolvimento intra-vetorial de <i>Leishmania</i> , tipo e mecanismo de transmissão	24
1.6 – Principais aspetos da monitorização e vigilância flebotomínica de uma região endémica	26
1.7 – Aspetos da luta vetorial no controlo integrado das Leishmanioses	27
1.8 – Objetivos	29
2 – Material e Métodos	31
2.1 – Caracterização da área de estudo	31
2.1.1 – Demografia	32
2.1.2 – Hidrologia	32
2.1.3 – Geologia	33
2.1.4 – Clima	33
2.1.4.1 – Temperatura	34
2.1.4.2 – Precipitação e Humidade Relativa	34
2.1.4.3 – Ventos dominantes	34
2.1.4.4 – Coberto Vegetal	34
2.1.4.5 – Fauna	35
2.2 – Estação flebotomínica escolhida: Freguesia de Alcântara, Concelho de Lisboa, Distrito de Lisboa	36
2.2.1 – Captura de flebótomos (Diptera, Pshychodidae).....	37

2.2.2 – Período de prospeção, método de captura e conservação do material ...	38
2.2.3 – Biótopos prospectados	39
2.2.3.1 – Divisão e caracterização dos vários tipos e variedades de biótopos	39
2.2.3.2 – Elaboração e utilização de Ficha de Campo	41
2.3 – Identificação morfológicas dos flebótomos capturados	42
2.3.1 – Identificação morfológica das espécies flebotomínicas: machos	43
2.3.2 – Identificação morfológica das espécies flebotomínicas: fêmeas	43
2.4 – Parâmetros bioecológicos determinados	45
2.4.1 – Espécies flebotomínicas capturadas	45
2.4.2 – Determinação da abundância relativa das espécies	45
2.4.3 – Razão dos sexos dos exemplares capturados	45
2.4.4 – Número de fêmeas alimentadas e grávidas	45
2.4.5 – Determinação do grau de rotação da genitália dos machos, total e por espécie flebotomínica	45
2.4.6 – Determinação da taxa de infestação de flebotomíneos por ectoparasitas	46
2.4.7 – Determinação da taxa de infecção de flebotomíneos por endoparasitas não <i>Leishmania</i>	46

2.4.8 – Número de flebotomíneos capturados por tipo e variedade de biótopos	prospetados	46
2.4.9 – Determinação da densidade flebotomínica por espécie e por meses	de	captura
2.4.10 – Influência das fases lunares nas densidades flebotomínicas		47
2.5 – Análise Molecular		47
2.5.1 – Técnicas de detecção de <i>Leishmania</i> sp. em flebótomos fêmeas capturadas na estação flebotomínica de Alcântara, Lisboa, 2015		47
2.5.1.1 – Extração de ADN		47
2.5.1.2 – Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)		48
2.5.1.3 – Amplificação de ADN do cinetoplasto		48
2.5.1.4 – Amplificação de ADN ribossomal		49
2.5.2 – Técnicas de identificação das fontes de alimentação sanguínea em flebótomos fêmeas capturadas na Estação flebotomínica de Alcântara, Lisboa, 2015		50
2.5.2.1 – Reação em Cadeira da Polimerase (PCR)		50
2.5.2.2 – Amplificação de um fragmento do gene <i>citocromo b</i>		51
2.5.2.3 – Verificação da amplificação		51
2.5.2.4 – Sequenciação e análise dos segmentos de ADN		51
2.6 – Análise estatística		52
3 – Resultados		53

3.1. – Espécies flebotomínicas identificadas morfologicamente, de ambos os sexos, capturadas na Freguesia de Alcântara, Lisboa, 2015	53
3.1.1 – Abundância relativa	55
3.1.2 – Razão dos sexos	56
3.1.3 – Fêmeas flebotomínicas alimentadas e grávidas, capturadas por armadilha CDC	57
3.1.4 – Percentagem de flebotomíneos machos com a genitália externa, total ou parcialmente rodada, por espécie	57
3.1.5 – Flebotomíneos capturados, de ambos os sexos, com ectoparasitas e endoparasitas não pertencentes ao género <i>Leishmania</i>	59
3.1.6 – Flebotomíneos capturados, por espécie e por tipo de biotópos prospectados	60
3.1.7 – Densidade flebotomínica por espécie e por meses de captura e variação sazonal	62
3.2 – Influência das fases lunares nas densidades flebotomínicas, maio a novembro, 2015	63
3.3 – Detecção molecular de <i>Leishmania</i> sp. nas fêmeas capturadas, Alcântara, Lisboa	63
3.4 – Identificação molecular das refeições sanguíneas, das fêmeas ingurgitadas, em diferentes hospedeiros vertebrados, Alcântara, Lisboa	64
3.5 – Análise estatística dos resultados obtidos	67
4 – Discussão e Conclusões	69
5 – Referências Bibliográficas	74
6 – Anexo	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Criança, lactente, com leishmaniose visceral	1
Figura 2 – Regiões endémicas de leishmaniose humana, visceral (LV) e cutânea (LCt). Dados reportados em 2014	2
Figura 3 – a - Leishmaniose visceral (LV) reportada em 14 países com elevada morbilidade, 1998-2014; b - Leishmaniose cutânea (LCt) reportada em 12 países com elevada morbilidade, 1998-2014	3
Figura 4 – 1- Formas promastigotas de <i>Leishmania</i> sp. no hospedeiro invertebrado; 2- amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. no hospedeiro vertebrado	6
Figura 5 – Transmissão vetorial de <i>Leishmania</i> spp.: insetos vetores; hospedeiros vertebrados/reservatórios; leishmaniose humana e/ou animal; ciclos zoonóticos e/ou antroponóticos	8
Figura 6 – Flebotomíneo fêmea (Diptera, Psychodidae)	9
Figura 7 – Número de casos identificados de leishmaniose visceral em Portugal, 1950- 2014. Está representado com um círculo vermelho, os dados do relatório das Doenças de Declaração Obrigatória 2011-2014 da DGS	11
Figura 8 – Mapa da prevalência de leishmaniose canina em Portugal. Assinalado, a azul, o Distrito de Lisboa	12
Figura 9 – Distribuição atual das espécies flebotomínicas, do género <i>Phlebotomus</i> na Europa a nível "regional" (NUTS 3)	15
Figura 10 – Perfis dos índices de frequência segundo os diferentes andares bioclimáticos das espécies <i>Phlebotomus papatasi</i> , <i>Phlebotomus sergenti</i> , <i>Phlebotomus</i> <i>perniciosus</i> e <i>Phlebotomus ariasi</i> , em Portugal. Assinalado, a vermelho, as espécies comprovadamente vetorais no País	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 11 – Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae): aspetos morfológicos das fases imaturas (ovos, larvas e pupa) e imagos ou adultos (macho e fêmea)	20
Figura 12 – Ciclo de vida dos flebotomíneos: fase terrestre (formas imaturas) e fase aérea (imagos ou adultos)	24
Figura 13 – Aparelho digestivo de flebotomíneo fêmea e desenvolvimento intravetorial de <i>Leishmania</i> sp.	26
Figura 14 – Mapa de Portugal, com a localização de Lisboa e suas freguesias, com destaque para área de estudo: Freguesia de Alcântara (38° 42' 33'' N - 9° 10' 27'' O), representada a vermelho	32
Figura 15 – Estação flebotomínica de Alcântara, assinalada com um círculo vermelho, correspondendo a uma área urbana da freguesia de Alcântara, Lisboa, 2015. No canto inferior esquerdo, observa-se o IHMT e o Centro de Congressos, à direita uma marina e o Rio Tejo.....	37
Figura 16 – Armadilha luminosa miniaturizada tipo CDC e respetiva gaiola, utilizada na captura de flebótomos na Estação flebotomínica de Alcântara, Lisboa, 2015	39
Figura 17 – Biótopos: domésticos, variedades dos mesmos e peridoméstico: 1- Churrasqueira/exterior, pertencente à casa 1; 2 - Casa das máquinas/entrada/exterior; 3 - Casa das máquinas/tubos/interior; 4 - Aviário (fotografia de S. Gouveia, 2015).....	40
Figura 18 – Os flebotomíneos machos e fêmeas foram separados ao estereomicroscópio. As fêmeas, após disseção dos últimos segmentos abdominais, e identificação ao microscópio ótico, foram colocadas em tubos de Eppendorf, com soluto tampão de lise, e devidamente etiquetados, para posterior análise molecular (seta vermelha)	42
Figura 19 – Observação, identificação e registo fotográfico das espermatecas das diferentes espécies flebotomíneas capturadas	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 20 – Material utilizado para a extração de ADN a partir de flebotomos fêmeas	48
Figura 21 – Termociclador BIORAD (T100 TM Termal Cicler) utilizado na PCR com as amostras no seu interior	49
Figura 22 – Espermateca de <i>Phlebotomus perniciosus</i> identificada por microscopia ótica	54
Figura 23 – Espermateca de <i>Phlebotomus ariasi</i> identificada por microscopia ótica ...	54
Figura 24 – Espermateca de <i>Phlebotomus sergenti</i> identificada por microscopia ótica	55
Figura 25 – Espermateca de <i>Sergentomyia minuta</i> identificada por microscopia ótica	55
Figura 26 – Abundância relativa (%) das espécies flebotomínicas capturadas em Alcântara, Lisboa, maio a novembro, 2015	56
Figura 27 – Grau de rotação das genitálias externas dos machos (%), das espécies flebotomínicas capturadas em, Alcântara, Lisboa, 2015. RT - Rotação total, RP - Rotação parcial e NR - Não rodada	58
Figura 28 – <i>Phlebotomus perniciosus</i> macho infestado com três ácaros observados ao estereomicroscópio, e assinalados com três setas azuis	59
Figura 29 – <i>Phlebotomus perniciosus</i> fêmea infetada com um nemátode, que se detetou nos 3 últimos segmentos abdominais, junto à espermateca, por observação ao microscópio ótico	60
Figura 30 – Estação flebotomínica de Alcântara, Lisboa, 2015, assinalados os diferentes tipos de biótopos. Casa 1: 1- Churrasqueira, 2 – Entrada/tubos, 3 – Cave/tubos e Casa 2: 4 – Aviário. Retângulo azul: piscina da Casa 1	61

Figura 31 – Densidades, por espécie e total, dos flebotomíneos capturados de maio a novembro, 2015, na Estação flebotomínica de Alcântara, Lisboa	62
Figura 32 – Densidades flebotomínicas totais durante as fases de Lua Cheia (LC) e Lua Nova (LN), de maio a novembro 2015, Alcântara, Lisboa	63
Figura 33 – Eletroforeses em gel de agarose de produtos de amplificação por PCR com os Primers MC1/ MC2 e LITSR / L5.8S. (A) MC1/ MC2 - Linha 1-20: produtos de PCR, Linha 21: controlo negativo (sem ADN), Linha 22: controlo positivo (amostra de ADN de <i>Leishmania</i> sp.) (B) LITSR/L5.8S - Linha 1-13: produtos de PCR, Linha 14: controlo positivo (amostra de ADN de <i>Leishmania</i> sp.), Linha 15: controlo negativo. M: Marcador de massa molecular de 100 pb	64
Figura 34 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR com as sequências iniciadoras do segmento do gene <i>cyt b</i> de vertebrados. Linha 1-23: amostras de fêmeas de flebótomos ingurgitadas, Linha 24: controlo negativo, M: marcador molecular de 100 pb	65
Figura 35 – Proporção (%) das diferentes fontes de alimentação de fêmeas ingurgitadas capturadas em Alcântara, Lisboa, maio a novembro, 2015	66

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Principais espécies patogénicas de <i>Leishmania</i> agrupadas em função das formas clínicas da doença e das áreas geográficas de distribuição. Assinalada com um círculo vermelho está representada a espécie patogénica de <i>Leishmania</i> , autóctone em Portugal para LV e LCt	5
Quadro 2 – Número e espécies de flebótomos capturados, em Alcântara, de junho a novembro de 2015	53
Quadro 3 – N° de flebótomos, de ambos os sexos, por espécie, capturados em Alcântara, Lisboa, e a razão machos / fêmeas, maio a novembro, 2015	56
Quadro 4 – Número de fêmeas ingurgitadas e grávidas, das espécies flebotomínicas capturadas em Alcântara, Lisboa, maio a novembro, 2015	57
Quadro 5 – Número de flebótomos capturados, por espécie, sexo, e por tipo de biótopos prospetados, em Alcântara, Lisboa, maio a novembro, 2015. PN - <i>P. perniciosus</i> ; PA - <i>P. ariasi</i> ; PS - <i>P. sergenti</i> ; SM - <i>Sergentomyia minuta</i> ; BDM - biótopo doméstico e BPDM - Biótopo peridoméstico	61
Quadro 6 – Identificação da fonte de alimentação sanguínea de flebótomos fêmeas capturadas em Alcântara, Lisboa, maio a novembro, 2015, por análises das sequências obtidas após a amplificação de um segmento do gene <i>cyt b</i>	67
Quadro 7 – Nível de significância para <i>P. perniciosus</i> / <i>P. ariasi</i>	67
Quadro 8 – Nível de significância para o número total de flebotomíneos machos e fêmeas	68
Quadro 9 – Nível de significância para as densidades flebotomínicas, por espécie, e por mês de captura	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Percentagem

ADN - Ácido desoxirribonucleico, do inglês - Deoxyribonucleic acid (DNA)

ADNk - ADN cinetoplastideal

AFR - Região Africana da OMS;

AML - Área Metropolitana de Lisboa

AMR - Região das Américas da OMS;

ARSLVT - Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale Do Tejo

BDM - Biótopo Doméstico

BPDM - Biótopo Peridoméstico

CDC - Centers for Diseases Control and Prevention

Cyt b - Citocromo b

cm - Centímetro

CML - Câmara Municipal de Lisboa

COI - Citocromo c Oxidase Subunidade I

DDO - Doenças de Declaração Obrigatória

DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DDET - N,N-dietil-3-metilbenzamida

DGS - Direção Geral de Saúde

DM - Doméstico

DRE - Diário da República Eletrónico

ECDC - Do inglês “European Centre for Disease Prevention and Control”

EDEN - Do inglês “Emerging Diseases in a changing European Environment”

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês - Ethylenediamine tetraacetic acid

ELISA - Do inglês “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”

EMR - Região do Mediterrâneo Oriental da OMS;

EU - União Europeia, do inglês “European Union”

EUR - Região Europeia da OMS

GHTM - Global Heath & Tropical Medicine

GPS - Sistema de posicionamento global, do inglês “global positioning System”

IHMT - Instituto de Higiene e Medicina Tropical

INE - Instituto Nacional de Estatística

INSA - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

IPK - Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

IPMA - Instituto Português do Mar e da Atmosfera

ITS - Espaçadores internos transcritos, do inglês “Internal transcribed spacers”

km - Kilómetro

km² - Kilómetro quadrado

L. - *Leishmania*

LCt - Leishmaniose Cutânea

LC - Lua Cheia

LMC - Leishmaniose Mucocutânea

LN - Lua Nova

LV - Leishmaniose Visceral

m - Metro

M - Mol

m² - Metro quadrado

m/s - Metro por segundo

min. - Minutos

mm - Milímetro

MPM - Mestrado de Parasitologia Médica

N - Norte

NIFA - Não identificada a fonte de alimentação

NUTS - Nomenclatura das Unidades Territoriais para Fins Estatísticos

NUTS III - Constituído por 25 unidades, 23 no continente e 2 correspondentes às Regiões Autónomas dos Açores e da Madeira

O - Oeste

°C - Grau Celsius

OMS - Organização Mundial de Saúde

P. - *Phlebotomus*

PA - *Phlebotomus ariasi*

pb - Pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase, do inglês - Polymerase chain reaction

PDM – Peridoméstico

pM - Picomol

PN – *Phlebotomus perniciosus*

PS – *Phlebotomus sergenti*

RFLP - Hidrólise do ADN amplificado por endonucleases de restrição, do inglês
“Restriction fragment lenght polymorphism”

RNA - Ácido ribonucleico, do inglês —Ribonucleic acid

rRNA - Ácido ribonucleico ribossômico, do inglês —Ribosomal ribonucleic acid

SEAR - Região do Sudeste da Ásia da OMS;

seg. – Segundos

SGP – Sociedade Geológica de Portugal

SIAM – Do inglês “Scenarios, Impacts and Adaptation Measures” I e II

SIDA - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

SM – *Sergentomyia minuta*

TAE - Tris-Acetato-EDTA

UEI – Unidade de Ensino e Investigação

UNL - Universidade Nova de Lisboa

V- Volt

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

x – Vezes

µm - Micrómetro

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Distribuição global das leishmanioses

As leishmanioses constituem um importante problema de saúde pública e animal, verificando-se uma distribuição mundial da leishmaniose humana em 98 países e estimando-se a existência de 90.000-130.000 novos casos por ano. Calcula-se que 350 milhões de pessoas vivam em áreas de transmissão vetorial de *Leishmania* e ocorra, por ano, 20.000 a 30.000 mortes (Ready, 2010; OMS, 2016). Com a exceção da Antártida, o protozoário *Leishmania* spp. está presente em todos os continentes e as leishmanioses são endêmicas em regiões temperadas, tropicais e sub-tropicais (Spickler et al., 2010).

Existem três principais formas de doença: a leishmaniose visceral humana (LV), também conhecida como kala-azar (Figura 1); leishmaniose cutânea (LCt) e leishmaniose mucocutânea (LMC). A leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença, enquanto que a leishmaniose visceral é a mais grave e pode ser fatal se não for tratada, estimando-se entre 0,2 e 0,4 milhões de novos casos por ano, a nível mundial. A leishmaniose é ainda classificada como antroponótica ou zoonótica, dependendo do reservatório natural do parasita: humano ou animal (Antunes, 2003).



A vermelho está marcada a hepatoesplenomegalia

Figura 1 – Criança, lactente, com leishmaniose visceral (adaptado de Lamounier-Costa & Nery-Costa, 2014).

Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que 90% dos casos de LV global ocorram em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia,

Sudão do Sul e Sudão. Relativamente à LCt, 70% ocorrem em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, República Islâmica do Irão, Peru, Sudão e República Árabe da Síria (OMS, 2016).

A prevalência mundial é de 12 milhões de casos, com uma incidência de 2 milhões, dos quais 0,2-0,4 milhões são de LV e 0,7-1,2 milhões são de LCt. As infecções humanas são encontradas também na Europa, incluindo França, Itália, Grécia, Malta, Espanha e Portugal. Estima-se que a incidência de LV aumente cerca de dois milhões de casos, por ano, em zonas endêmicas, nomeadamente na América Latina, África, Índia, Médio Oriente e Bacia Mediterrânica (OMS, 2008; Ready, 2010; OMS, 2016).

Relativamente aos mais recentes dados, reportados em 2014, dos 25 países selecionados, onde se verifica uma maior incidência de leishmaniose, 13 apresentaram uma elevada morbilidade para LV; 11 uma alta morbilidade para LCt; e 1 (Brasil) verificou-se uma elevada morbilidade para ambas as leishmanioses, LV e LCt (Figura 2).

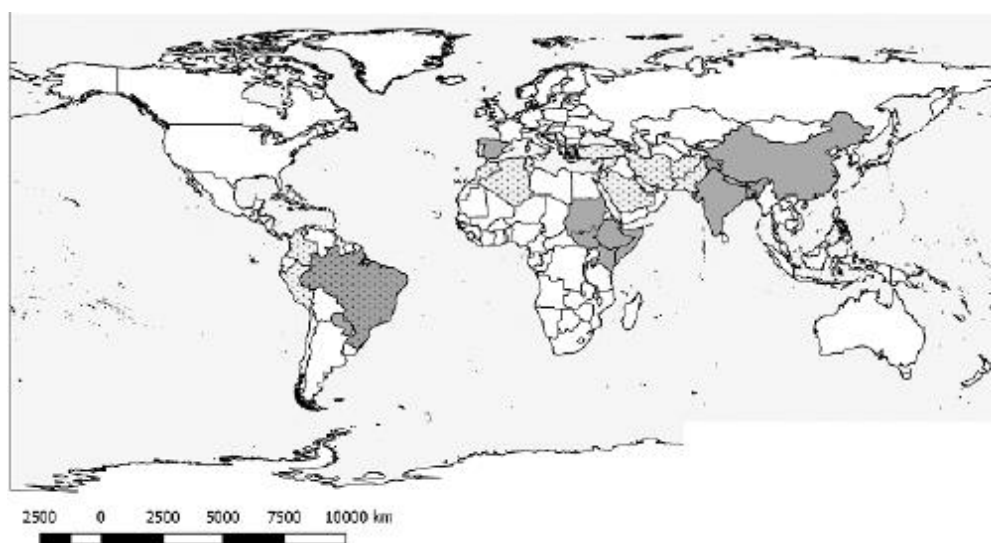


Figura 2 – Regiões endêmicas de leishmaniose humana, visceral (LV) e cutânea (LCt). Dados reportados em 2014.

- ☐ Países cuja morbilidade não é elevada para LV e LCt;
- ☒ Países com elevada morbilidade para LV;
- ☒ Países com elevada morbilidade para LCt.

(Adaptado de <http://www.who.int/wer/2016/wer9122.pdf?ua=1>, acedido a 1 de agosto de 2016).

A Figura 3, a e b, ilustra a evolução do número de casos de LV e LCt, relatados pela OMS, em países com elevada morbidade, no período compreendido entre 1998-2014. Nos 12 países com alta morbidade de LCt, o número de casos triplicou, num curto espaço de tempo, de mais de 50.000 em 1998 para mais de 150.000 em 2005. Nos 14 países com elevada morbidade de LV, o número de casos também triplicou, primeiramente, de mais de 20.000, em 1998, para mais de 60.000 em 2011, diminuindo gradualmente desde 2013.

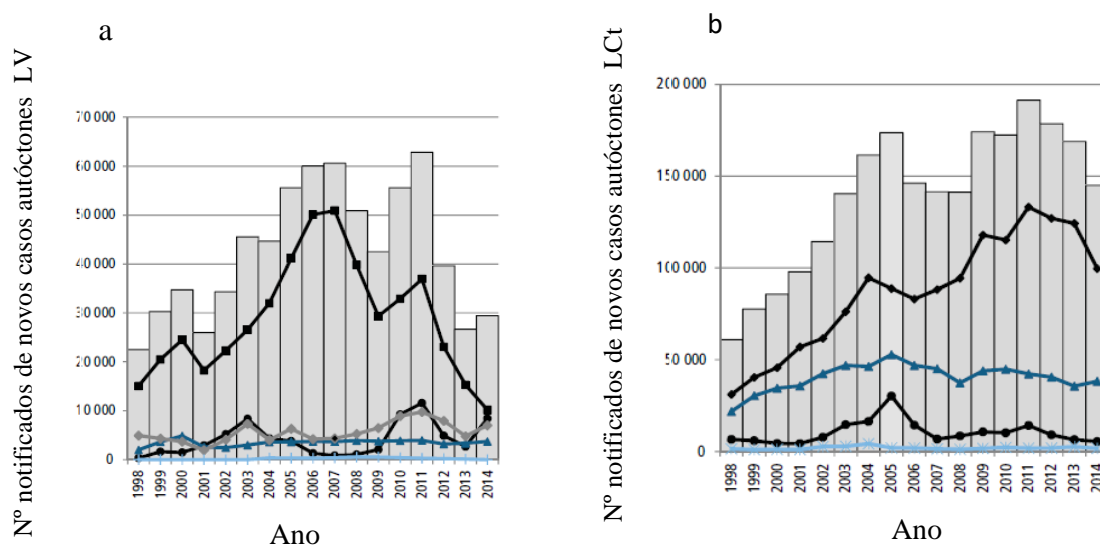








Figura 3 – a - Leishmaniose Visceral (LV) notificada em 14 países com elevada morbidade, 1998-2014; b – Leishmaniose Cutânea (LCt) notificada em 12 países com elevada morbidade, 1998-2014.

-  Países com elevada morbidade;
-  AFR: Região Africana (OMS);
-  AMR: Região das Américas (OMS);
-  SEAR: Região do Sudeste da Ásia (OMS);
-  EMR: Região do Mediterrâneo Oriental (OMS);
-  EUR: Região Europeia (OMS).

(Adaptado de <http://www.who.int/wer/2016/wer9122.pdf?ua=1>, acedido a 1 de agosto de 2016).

1.2 – Epidemiologia das leishmanioses

1.2.1 – Agente etiológico - *Leishmania* spp.

Os agentes etiológicos das leishmanioses, várias espécies de *Leishmania*, são parasitas, protozoários classificados taxonomicamente como pertencentes ao Reino Protista, Subreino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora, Classe Zoomastigophora, Ordem Kinetoplastida, Subordem Trypanosomatina, Família Trypanosomatidae e Gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Semião-Santos, 1996). As diferentes espécies de *Leishmania* são transmitidas por diferentes espécies flebotômicas e afetam seres humanos e/ou animais, tanto domésticos como silváticos (Campillo et al., 1999).

Considera-se que existam espécies parasitárias de países do Novo Mundo e outras de países do Velho Mundo. O Novo Mundo inclui todo o Hemisfério Oeste, do qual faz parte o continente americano, enquanto o Velho Mundo contém o Hemisfério Este, do qual faz parte a Europa, África, Médio Oriente e Ásia (Reuss, 2013).

Cerca de 20 espécies de leishmanias são patogénicas para o ser humano, podendo causar manifestações clínicas - cutâneas, mucocutâneas e/ou viscerais e apesar de geralmente existir associação entre as espécies de *Leishmania* e a manifestação clínica correspondente, esta não é absoluta (Branco, 2011), (Quadro 1).

L. infantum (sinónimo de *L. chagasi*) é a responsável pelo desenvolvimento da LV zoonótica na América do Sul e Central e na Bacia do Mediterrâneo, enquanto *L. donovani* é responsável por LV na Ásia e Este de África. *L. tropica* é responsável pelo aparecimento de LCt, ocorrendo por transmissão antroponótica, ou seja, de pessoa a pessoa, através da picada de flebotomos (Maroli, 2013), sendo *P. sergenti* o vetor comprovado desta espécie dermatrópica, como demonstraram estudos realizados na Argélia (Boubidi et al., 2011) e Tunísia (Tabbabi et al., 2011).

Quadro 1 – Principais espécies patogénicas de *Leishmania* agrupadas em função das formas clínicas da doença e das áreas geográficas de distribuição. Assinalada com um círculo vermelho está representada a espécie patogénica de *Leishmania*, autóctone em Portugal para LV e LCt (adaptado de

http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/2232/3/Livro_Doencas_associadas_a_artropodes_vetores_e_roedores.pdf; acedido a 11 de agosto de 2016).

Apresentação Clínica	Espécies	Localização geográfica
Leishmaniose cutânea	<i>Leishmania tropica</i> <i>L. major</i> <i>L. aethiopica</i>	<u>Velho Mundo</u> : Bacia do Mediterrâneo, Ásia, Médio Oriente, Afeganistão, norte de África, Quénia.
	<i>L. mexicana</i>	<u>Novo Mundo</u> : América central e Bacia do Amazonas
Leishmaniose mucocutânea	<i>L. braziliensis</i>	<u>Novo Mundo</u> : Brasil e outros países da América Latina
Leishmaniose visceral	<i>L. donovani</i>	<u>Velho Mundo</u> : Ásia (China, Índia e Irão) e África (Sudão, Quénia e Etiópia)
	<i>L. infantum</i> (sinónimo <i>L. chagasi</i>)	Bacia do Mediterrâneo (Portugal) e norte de África <u>Novo Mundo</u> : Norte e Nordeste do Brasil, alguns focos noutros países da América Latina

As leishmanias requerem dois hospedeiros para completar o seu ciclo de vida. No vetor (hospedeiro invertebrado) o parasita ocorre sob a forma promastigota e no vertebrado ocorre sob a forma amastigota (Ciaramella & Corona, 2003). Estas formas têm características morfológicas distintas:

- Promastigotas: encontram-se no intestino do hospedeiro invertebrado (Greene, 2006), e caracteriza-se pela sua forma alongada, presença de um único núcleo, um flagelo anterior e um cinetoplasto. O cinetoplasto corresponde à área mitocondrial do parasita que possui o material genético. O flagelo encontra-se na proximidade do cinetoplasto, e promove a mobilidade da forma promastigota. Estas formas, reproduzem-se por divisão binária longitudinal (Figura 4 - 1) (Rosypal et al., 2003);

- Amastigotas: encontram-se no interior dos macrófagos do hospedeiro vertebrado, reproduz-se por divisão binária no interior das células fagocíticas mononucleares, sendo posteriormente libertados aquando da sua rutura (Baneth et al., 2008). São estruturas ovóides ou redondas, têm cerca de 2 a 5 μm de diâmetro, possuem um único núcleo excêntrico, um cinetoplasto e um flagelo rudimentar (Figura 4 - 2) (Ciaramella & Corona, 2003; Green, 2006).

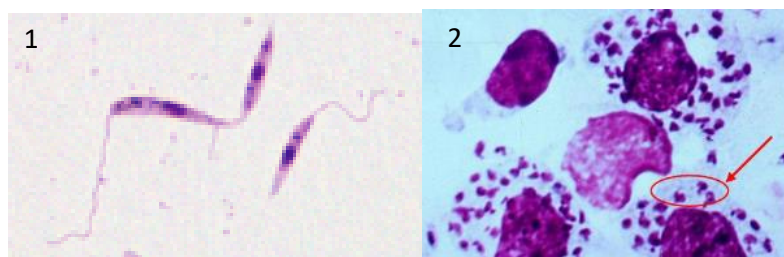


Figura 4 – 1- Formas promastigotas de *Leishmania* sp. no hospedeiro invertebrado (adaptado de <http://www.leishrisk.net/Default.aspx?Menu=MenuMain&MIID=34&WPID=40&L=E>; acedido a 29 de julho 2016); 2- amastigotas no hospedeiro vertebrado (seta vermelha) (adaptado de: https://www.ufpe.br/biolmol/LeishmaniosesApostila_on_line/origem_classificacao.htm; acedido a 29 de julho 2016).

1.2.2 – Hospedeiros Vertebrados / Reservatórios

Os ciclos de transmissão das leishmanioses dependem da presença dos seus reservatórios, e a identificação destes hospedeiros, incluindo também os vetores, é essencial para o controlo da transmissão dos agentes patogénicos e dos respetivos focos (Ferreira, 2010).

O conceito básico de reservatório animal, consiste numa espécie animal, representada como fonte de infeção para determinado agente patogénico, e que mantem o ciclo da doença numa área, em que outros animais, incluindo o ser humano, se podem infectar por transmissão vetorial, como no caso das leishmanioses ou de outras doenças transmitidas por vetores. Assim, o reservatório mantem o parasita em circulação, independentemente de ficar doente ou não, de forma a que o agente patogénico possa

ser transmitido à mesma espécie animal ou a outras suscetíveis ao mesmo (Figura 5) (Barral & Costa, 2011).

A nível global e no que diz respeito às leishmanioses, os reservatórios de *Leishmania* são mamíferos silvestres e sinantrópicos, sendo os mamíferos o grupo de animais mais afetados pela infeção por *Leishmania* spp. (Campino & Maia, 2010). O número de espécies animais que atua como reservatório para cada uma das espécies patogénicas de *Leishmania* é limitado, apesar de também poderem infetar e causar doença a outros animais.

O cão (*Canis familiaris*) é o principal hospedeiro definitivo doméstico e peridoméstico de *Leishmania infantum* e reservatório da leishmaniose visceral humana (Campino & Maia, 2010), sendo responsável pelo surgimento e manutenção de focos endémicos e epidémicos da doença (Silva et al., 2001). Nicolle e Comte descreveram, pela primeira vez, em 1908 na Tunísia, leishmaniose em cães. Alguns animais domésticos foram encontrados infetados por esta espécie viscerotrópica, tais como equinos (Rolão et al., 2005), suínos (Brazil et al., 1987) e felinos (Pennisi et al., 2004; Souza et al., 2005; Maia et al., 2008), sendo estes considerados reservatórios secundários (Barral & Costa, 2011). Nalguns países do sul da Europa, tal como Portugal, a raposa foi identificada como potencial reservatório silvático de *L. infantum* (Abranches, 1984).

É necessário o conhecimento da diversidade genética das espécies de *Leishmania*, as repercussões das mesmas nos focos existentes, bem como nos reservatórios implicados no ciclo enzoótico, pois só assim será possível avaliar qual o método, ou métodos, de controlo mais eficazes, independentemente das ações anti-vetoriais que possam ser utilizadas (Andrade et al., 2012).

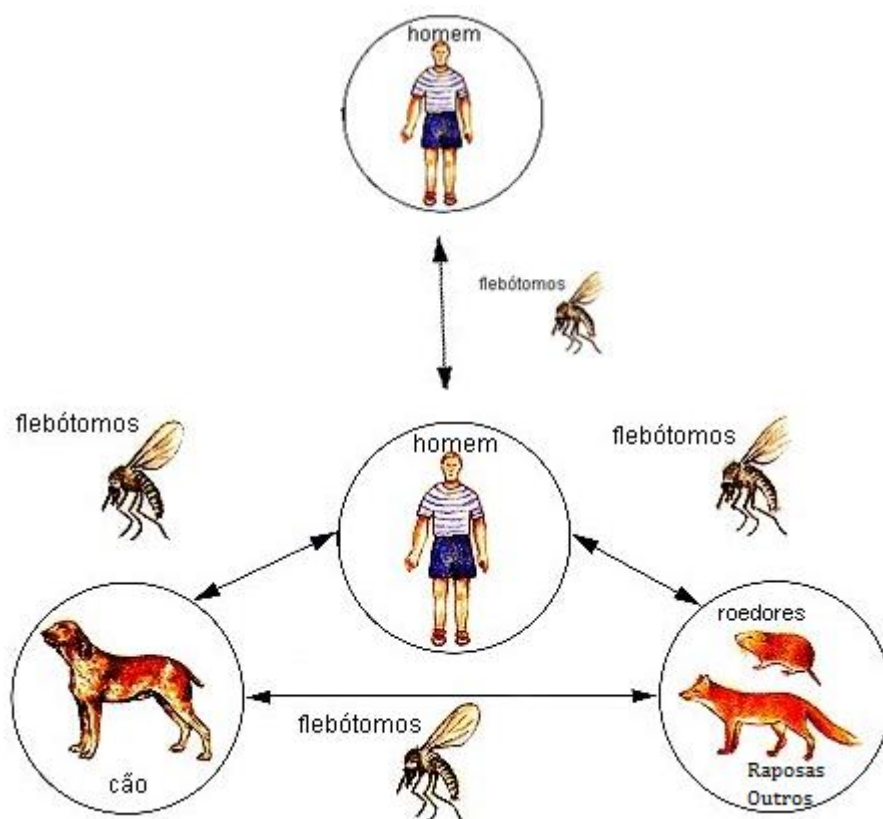


Figura 5 – Transmissão vetorial de *Leishmania* spp.: insetos vetores; hospedeiros vertebrados/reservatórios; leishmaniose humana e/ou animal; ciclos zoonóticos e/ou antroponóticos (adaptado de http://www.adventurezone.com.br/img_editor/leishmaniose003.jpg; acessado a 4 de agosto de 2016).

1.2.3 – Vetores - Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae)

Em Portugal, e nas áreas endêmicas, os flebotomíneos são ainda conhecidos como “mosquitos pequeninos”, sendo, na maior parte das vezes, confundidos erradamente com os “verdadeiros” mosquitos (Família Culicidae). Independentemente de outras características bioecológicas, morfologicamente os flebótomos são totalmente diferentes dos culicídeos.

Diferentes espécies flebotomínicas são vetoras de *Leishmania* spp. No entanto, a importância médica destes insetos está igualmente ligada à transmissão de outros agentes patogénicos, como por exemplo o arbovírus Toscana, em alguns países do Velho Mundo, e *Bartonella bacilliformis* nos Andes e Perú (Novo Mundo).

INTRODUÇÃO

Os flebótomos apresentam também importância médica como agentes de doença, uma vez que as picadas das fêmeas, em pessoas mais suscetíveis, não só aos componentes da saliva mas também ao tipo de picada (telmofágicos), podem causar lesões cutâneas dando origem à Harara (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Para se conhecer e monitorizar as áreas endêmicas de leishmaniose e de outras doenças transmitidas por flebótomos, há que conhecer todas as suas principais características não só morfológicas mas também bioecológicas.

Os flebotomíneos são insetos nematóceros, dípteros, de reduzidas dimensões, com 2 a 3 mm de comprimento, de aparência frágil, que apresentam a seguinte característica: os voos são normalmente curtos e como se fossem “saltos” (Lewis, 1974). A coloração varia entre castanha clara a castanha escura, quase negra. As antenas, iguais em ambos os sexos, são constituídas por 16 segmentos, e os três pares de patas são longos. Os palpos são constituídos por 5 artículos, o aparelho bucal é do tipo picador-sugador, formado por 6 peças, sendo vulnerante nas fêmeas. O corpo é coberto por sedas finas e as asas são lanceoladas, pilosas, apresentando 6 nervuras longitudinais. A segunda nervura longitudinal é bifurcada duas vezes (Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae). Nos flebótomos, de ambos os sexos, quando estão em repouso, as asas ficam abertas sobre o tórax, em forma de “V” (Figura 6). Estes vetores apresentam dimorfismo sexual acentuado, a nível do aparelho genital, o que nos permite distinguir, aquando ainda estão nas gaiolas das armadilhas, se capturámos flebotomíneos machos e/ou fêmeas. (Rioux et al., 1969, Killick-Kendrick, 1999; Afonso, 2012).



Figura 6 – Flebotomíneo fêmea (Diptera, Psychodidae) (adaptado de http://diptera.info/photogallery.php?photo_id=4790; acedido a 17 de Agosto 2016).

1.3 – Leishmanioses em Portugal

O primeiro caso de LV, em Portugal, foi diagnosticado, em 1910, por Dionísio Álvares, numa criança de 9 anos, residente em Lisboa (Álvares, 1910). Em Portugal os primeiros casos de leishmaniose canina foram descritos em 1911 (Álvares & Silva, 1911).

Portugal tem registos dos casos de leishmaniose humana, cutânea e visceral, e canina, causada por *L. infantum*, ainda que a leishmaniose cutânea não seja de notificação obrigatória. Embora a LV seja a forma clínica mais comum no País, estimam-se que sejam diagnosticados anualmente cerca de dez novos casos de LCt (Campino & Maia, 2010).

Segundo os dados da Direção Geral de Saúde (DGS), Portugal apresentava uma alta incidência de LV, 1.616 casos, entre 1942-1951, tornando-se uma doença de notificação obrigatória desde 1948 (Portaria nº 1071/48, de 31 de Dezembro). Em 1970, o número absoluto de casos notificados foi o mais baixo de sempre com apenas 20. Após essa data, a leishmaniose notificada foi aumentando progressivamente até atingir um pico em 1983, data em que foram identificados 51 casos.

Apesar de no passado terem sido identificados três focos endémicos principais: a região do Alto Douro, a região de Lisboa e Vale do Tejo, e a região do Algarve (Abranches et al., 1984), ocorrem casos de leishmaniose por todo o País (Campino et al., 2009).

Devido à informação epidemiológica ser escassa, tornou-se pertinente iniciar investigações científicas que caracterizassem o perfil epidemiológico da LV, entre 1950 e 2014, e segundo o último relatório das Doenças de Declaração Obrigatória 2011-2014 da DGS (representado em círculo vermelho na Figura 7), foram notificados 39 casos de leishmaniose (32 confirmados e 7 prováveis), havendo uma maior incidência no último ano (2014) na faixa etária dos 25 aos 44 anos (Pinto et al., 2015). A leishmaniose em Portugal tem sido predominantemente infantil. Nos últimos tempos, verifica-se uma inversão desta tendência, registando-se um maior número de casos em adultos, principalmente casos de VIH/SIDA (Campino & Maia, 2010).

Entre 2008 a 2013, o Laboratório Nacional de Referência de Infecções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) confirmou 37 casos com suspeita clínica de leishmaniose. Segundo Elizabete Serrada (2010), entre

INTRODUÇÃO

1999-2009, dos 375 indivíduos internados com LV, em vários hospitais de Portugal continental, 38,6% foram notificados. O relatório anual de 2013 do European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) não refere quaisquer dados sobre a ocorrência de leishmaniose nos países europeus.

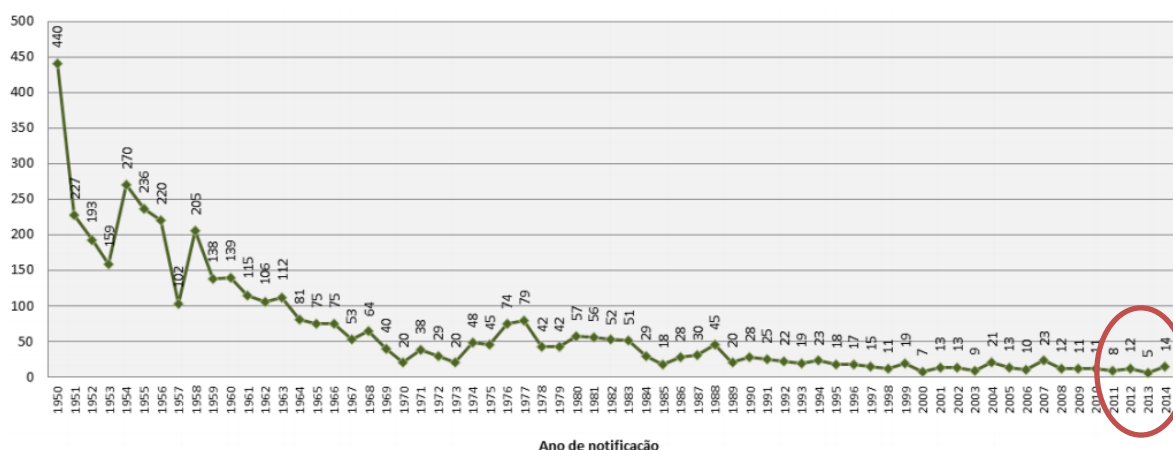


Figura 7 – Número de casos identificados de leishmaniose visceral em Portugal, 1950-2014. Está representado, com um círculo vermelho, os dados do relatório das Doenças de Declaração Obrigatória 2011-2014 da DGS (adaptado de <http://www.dgs.pt/estatisticas-de-saude/estatisticas-de-saude/publicacoes/doencas-de-declaracao-obrigatoria-2011-2014-volume-i2.aspx>; acedido a 23 de agosto, 2016).

Em 2012, a região da Grande Lisboa apresentou um número de casos notificados de SIDA, 5,6 em 100 000 habitantes, por ano (ARSLVT, 2015). O número de casos de LV, no mesmo ano, foi 0,4%, segundo os dados que constam das notificações de Doenças de Declaração Obrigatória (DDO) (ARSLVT, 2015). Esta sub-região apresenta o maior número de casos humanos de leishmaniose, sobretudo em indivíduos co-infectados com o VIH, verificando-se maior número de infeções em zonas urbanas em relação às áreas rurais (Campino & Maia, 2010). Este fenómeno pode ser explicado devido ao desvio trófico dos flebótomos vetores, em meio rural, podendo estar associado à urbanização ou domesticação de focos zoonóticos naturais. Como o vetor tem preferência por hospedeiros animais (zoofílico), o menor número de animais disponíveis nas áreas urbanas pode fazer com que a população humana fique mais vulnerável à infeção acidental (Campino & Maia, 2010).

O número de casos de leishmaniose canina tem vindo a aumentar no nosso País, estando esta zoonose incluída, desde 2002, no grupo das infeções de notificação obrigatório durante as campanhas de vacinação anti-rábica (Campino & Maia, 2010).

Em estudos realizados na cidade de Lisboa, entre 1945 e 1947, a seroprevalência (canina) foi de 6,5% entre 1945 e 1947; entre 1961 e 1962, foi de 3,5%; e em 1984 foram vários de 3,8% a 8,8%. Em 1989, em Alijó (norte do País) – 12,4%, em Loulé, Algarve, em 1992 – 7% e em Évora, 1991, foi de 3,9% (Figura 8) (Semião-Santos, 1996).

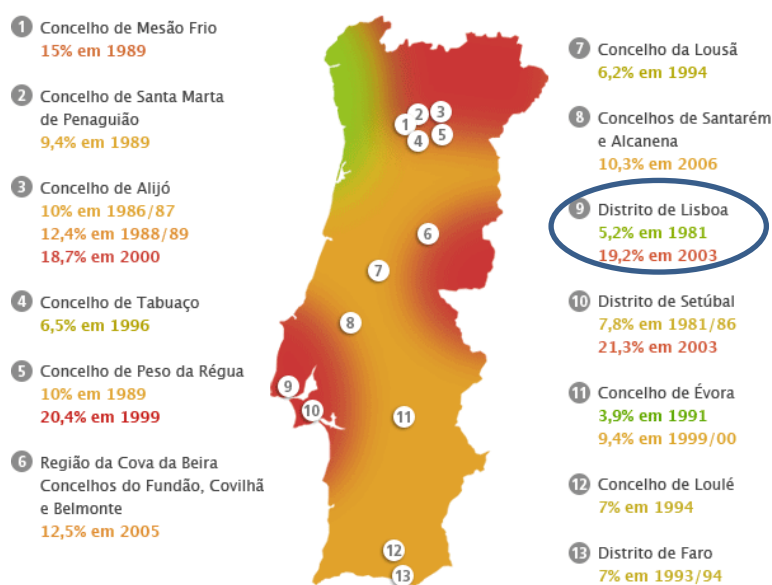


Figura 8 – Mapa da prevalência de leishmaniose canina em Portugal. Assinalado, a azul, o Distrito de Lisboa (adaptado de <http://www.onleish.org/index.php?article=25&visual=3>; acedido a 1 de setembro 2016).

No seguimento de um inquérito epidemiológico canino, na área urbana/sub-urbana da Grande Lisboa, verificou-se uma prevalência da infeção de 19,2% (Cortes et al., 2006). Segundo os autores mencionados, a elevada prevalência pode estar associada ao desenvolvimento não planeado das zonas sub-urbanas, sendo estas responsáveis pelo aumento dos resíduos sólidos, atraindo diversos animais, nomeadamente cães. Sendo o cão o principal reservatório de *Leishmania*, e vivendo, na maior parte das vezes, ao ar livre, torna-se um alvo mais fácil para a picada do inseto vetor e, consequentemente, para a transmissão vetorial do parasita (Solano-Gallego et al., 2007). Nesta mesma

região Maia et al. (2008; 2010) realizaram dois inquéritos de leishmaniose felina em Portugal, tendo a detecção de ADN de *L. infantum* no sangue periférico variado entre de 20,3% em gatos domésticos e 30,4%, em gatos errantes, sugerindo a importância destes animais na epidemiologia das leishmanioses.

1.3.1 – Espécies flebotomínicas e distribuição atual

O eminente Cientista Doutor Carlos França é considerado o primeiro Entomologista Médico de Portugal, que, para além de Entomologista, foi também Parasitologista e Bacteriologista. No que diz respeito à Entomologia Médica, e como primeiro flebotomologista, assinalou pela primeira vez, em 1912, em Colares, Sintra, a presença de *Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi*, na sequência de um surto de febre papatacci (França, 1913; Afonso et al., 2007a). A partir dessa data, esta espécie não tornou a ser capturada nesta região mas têm sido capturados exemplares no sul de Portugal, nomeadamente no Algarve e no Alentejo, ainda que apresentando fracas densidades.

Em 1918, o Doutor Carlos França, assinalou, também na mesma região, *P. (Larroussius) perniciosus*, a que chamou na época *P. lusitanicus*, e *P. (Paraphlebotomus) sergenti* (Afonso et al, 2007a). Presentemente, estão assinalados, em Portugal, dois géneros e cinco espécies flebotomínicas (Afonso & Alves-Pires, 2008):

Género *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840

- 1 – *Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi* (Scopoli, 1786)
- 2 – *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* Parrot, 1917
- 3 – *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus* Newstead, 1911
- 4 – *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* Tonnoir, 1921

Género *Sergentomyia* França & Parrot, 1920

- 5 – *Sergentomyia (Sergentomyia) minuta* (Rondani, 1843)

Das espécies flebotomínicas assinaladas no País, *P. perniciosus* e *P. ariasi* são as espécies comprovadamente vetoradas de *L. infantum* (Pires, 1984). São comprovadamente vetoradas, uma vez que:

- 1- Foram capturadas no terreno, em regiões endémicas de leishmaniose humana e canina, nomeadamente Trás-os-Montes e Alto Douro, Grande Lisboa (as duas

espécies) e Algarve (*P. perniciosus*) (Campino. et al., 1995; Alves-Pires et al., 2001; Afonso et al, 2005; Afonso et al., 2007b; Alves-Pires et al., 2008).

2- Fêmeas, das referidas espécies, foram dissecadas, e observou-se, ao microscópio ótico, o aparelho digestivo e a válvula estemodeal. Nesta válvula, detetaram-se formas metacíclicas do parasita que foram postas em cultura;

3- Verificou-se por tipagem isoenzimática, e mais recentemente por tipagem molecular, que os parasitas e zimodemes MON-1 (Alves-Pires et al., 2001) e MON-24 (Alves-Pires et al., 1991) eram idênticos aos isolados em humanos e cães.

A presença de *P. papatasi* e de *P. sergenti* no País, conduz ao risco de introdução de *L. major* e *L. tropica* respetivamente, ou seja, poderá verificar-se, a médio ou a longo prazo, casos autóctones de leishmaniose por estas espécies, tendo em conta as alterações climáticas, ambientais, migrações, turismo e outros fatores (Afonso et al., 2005).

Embora várias espécies do género *Sergentomyia* sejam comprovadamente vetoras de *Sauroleishmania* sp., nos últimos anos têm-se detetado espécies de *Leishmania* patogénicas para o Homem e para o cão em *Sergentomyia* sp. capturadas em vários países endémicos de leishmaniose humana. Em Portugal, ADN de *Leishmania* sp., e da espécie *L. major*, foi encontrado em fêmeas *S. minuta* capturadas no sul do País, revelando que esta espécie não se alimenta apenas em répteis (Campino et al., 2013; Maia et al., 2015).

De acordo com a distribuição atual das espécies flebotomínicas na Europa, *P. ariasi* está presente não só em Portugal mas também em França, Espanha, Itália e Andorra. *P. perniciosus* está presente em Portugal, Bulgária, Croácia, França, Malta, Espanha, Suíça, Alemanha, Andorra e Itália. A distribuição de *P. sergenti* ocorre em Portugal, Bósnia e Herzegovina, Bulgária, Chipre, Grécia, Itália, Espanha, França e Turquia. *P. papatasi* distribui-se por todo o sul da Europa, nomeadamente Portugal, Albânia, Bulgária, Croácia, Chipre, Grécia, Hungria, Itália, Montenegro, Sérvia, França, Espanha e Turquia (Figura 9) (ECDC, 2016).

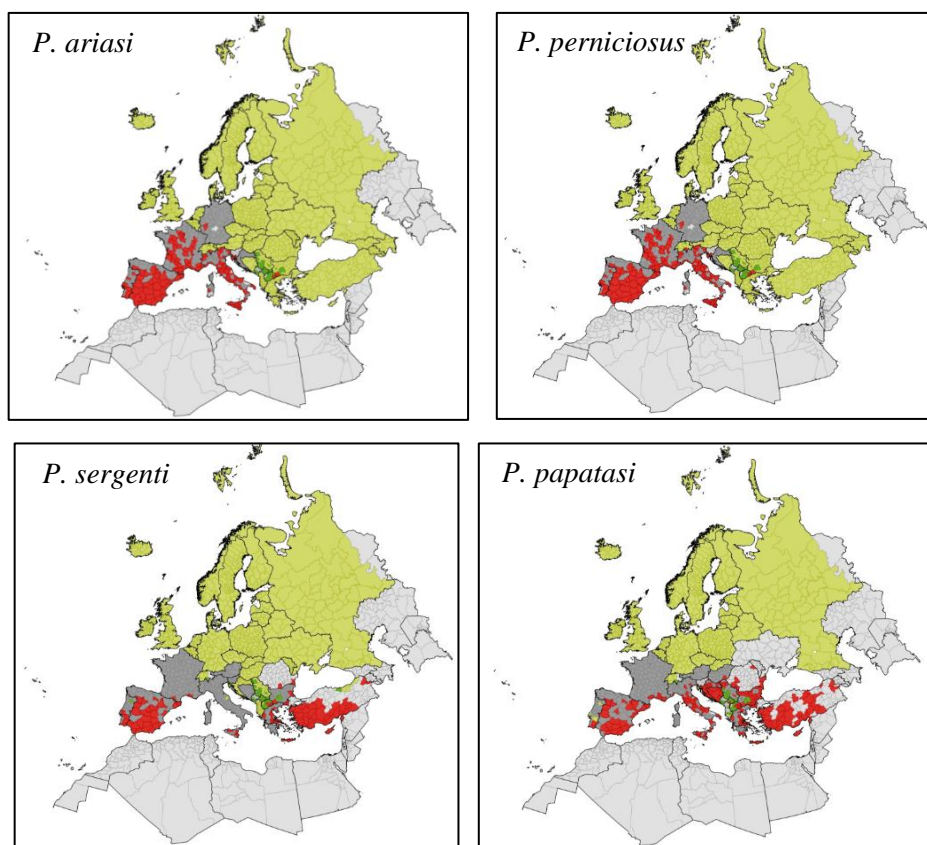


Figura 9 – Distribuição atual de espécies flebotomínicas, vetoras de *Leishmania* spp., na Europa a nível regional (NUTS III).

- Presente - A espécie é conhecida por ter estado, ou estar, presente em pelo menos um concelho dentro da unidade administrativa;
- Ausente - A espécie nunca foi relatada dentro da unidade administrativa, existindo trabalhos de campo, ou estudos sobre flebotominíneos, realizados nos últimos 5 anos;
- Ausência antecipada - A espécie nunca foi relatada e os especialistas estimam uma alta probabilidade de ausência, ou seja, que não possam vir a ocorrer;
- Não existem dados disponíveis através dos especialistas locais.

(Adaptado de http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/vector-maps/Pages/VBORNET_maps_sandflies.aspx; acedido a 25 de agosto, 2016).

1.3.2 – Influência das alterações climáticas e ambientais nas espécies flebotomínicas vetoras

As alterações ambientais, climáticas ou decorrentes de ações antrópicas, aliadas ao crescimento populacional e mudanças no padrão demográfico das cidades, nível socioeconómico, disponibilidade e qualidade dos serviços de saúde e educação,

deficiência de hábitos higiénicos, assim como a presença de hospedeiros apropriados, são fatores favoráveis ao surgimento de doenças potencialmente prejudiciais à saúde humana (Neves et al., 1997).

No seguimento do aumento generalizado de LV, ocorrido nos últimos 20 anos, especialmente na Europa, face ao aumento da co-infecção *Leishmania*/VIH (Kuhn et al., 2005), e aos cenários de alterações climáticas previstos para o futuro, tem-se verificado, cada vez mais, interesse nesta doença transmitida por vetores, ainda que seja considerada negligenciada.

Relativamente ao sul da Europa, estima-se que as alterações climáticas provoquem temperaturas mais elevadas e ocorram períodos de seca mais rigorosos. Na Europa Central e de Leste, a seca está relacionada com a diminuição da pluviosidade de verão, causando maior stress hídrico e o aumento de risco da degradação das condições de saúde devido a ondas de calor. Assim, os fenómenos extremos, devido às alterações climáticas, como ondas de calor, cheias e secas, poluição atmosférica e incidência de doenças infecciosas são responsáveis pelo impacto das alterações na saúde dos seres humanos e animais, com consequente aumento da taxa de morbilidade e mortalidade na Europa (Parry et al., 2007).

Num futuro próximo, prevê-se que os limites atuais da distribuição dos vetores e da leishmaniose humana e canina se estendam para o norte da Europa, causados pelo aumento da temperatura média global acima dos limites atuais da distribuição da doença (Watson et al., 1997). Em áreas endémicas, tal como Portugal, os flebótomos, especialmente *P. perniciosus*, poderão aumentar o seu período de atividade, o número de gerações anuais e densidades populacionais, podendo ocorrer a diminuição do período extrínseco do agente infeccioso no vetor (Casimiro *et al.*, 2006; Calheiros et al., 2006; Ready, 2008).

Existem várias lacunas no que diz respeito à correlação entre a leishmaniose e as alterações climáticas, no entanto, vários estudos apontam para um impacto significativo com um consequente aumento do risco de transmissão vetorial. São alvo de estudo alguns projetos internacionais, como o Projeto EDEN e EDENext (Emerging Diseases in a changing European Environment), financiado pela Comissão Europeia que reuniu a participação de investigadores de vários Países, incluindo Portugal, e que teve como principal objetivo compreender o impacto das atuais mudanças climáticas/ambientais na

difusão de novas doenças, emergentes, ou re-emergentes, no território europeu. Especificamente em Portugal, realizaram-se avanços significativos nos últimos anos pelo projeto SIAM (“Scenarios, Impacts and Adaptation Measures” I e II), estimando-se um aumento da temperatura de 3,3°C até ao ano 2040 e um aumento de 5,8°C até 2090.

De acordo com os últimos estudos efetuados no País, verifica-se um aumento do número de dias com temperaturas favoráveis (15-28°C) para a atividade de *P. perniciosus*, em todas as regiões do país, aumentando, consequentemente, o período favorável da transmissão de *L. infantum* (Casimiro & Calheiros, 2002; Casimiro *et al.*, 2006; Calheiros *et al.*, 2006). Estima-se que para *P. ariasi*, esta espécie diminua a atividade nas regiões Centro e sul do País, e aumente na região Norte, visto que, epidemiologicamente é na região de Alto Douro que tem uma maior importância vetorial (Calheiros *et al.*, 2006).

Em resumo, prevê-se que, de uma forma geral, as leishmanioses, endémicas em Portugal, sejam mais sensíveis a variações na temperatura (Casimiro *et al.*, 2006). Assim, o risco de transmissão de leishmaniose, que atualmente é considerado médio, possa aumentar (Abrantes & Silveira, 2009). Prevê-se no futuro, através de cenários climáticos, um aumento da densidade de flebotomos para mais do dobro nos meses de julho e agosto, no período 2020-2047, com tendência a aumentar a densidade flebotomínica em todos os meses (Casimiro *et al.*, 2010).

Relativamente aos ecossistemas terrestres e à sua biodiversidade, estima-se, em geral, um “deslocamento” dos ecossistemas para Norte e para maiores altitudes e uma perda de biodiversidade mais acentuada no Sul do que no norte da Europa, o que resultará muito provavelmente numa diminuição da capacidade de migração e adaptação dos ecossistemas às alterações climáticas (Santos & Miranda, 2006). Na população humana, a persistência de longos períodos de seca, ou inundações, contribui para a intensificação de processos migratórios, existindo a possibilidade de as pessoas suscetíveis deslocarem-se para áreas de risco ou, se infetadas, introduzir a doença em novas áreas (OMS, 2010).

Por estudos já realizados verifica-se, então, uma relação entre os fatores bioclimáticos, como a temperatura, humidade relativa do ar, pluviosidade, altitude, e a densidade flebotomínica, demonstrando que estes fatores podem influenciar a

ocorrência destes insetos em determinadas áreas (Figura 10) (Macedo *et al.*, 2008; Michalsky *et al.*, 2009; Amóra, 2010, Afonso, 2015, Alten *et al.*, 2016).

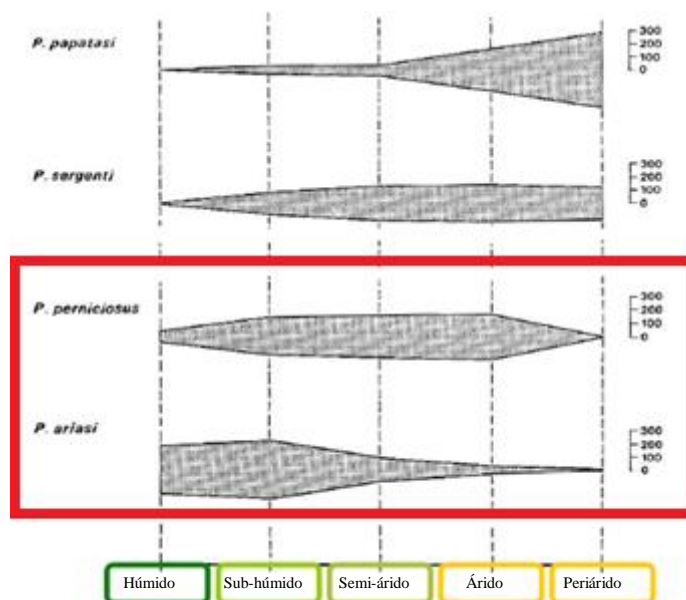


Figura 10 – Perfis dos índices de frequência segundo os diferentes andares bioclimáticos das espécies *Phlebotomus. papatasi*, *Phlebotomus. sergenti*, *Phlebotomus. perniciosus* e *Phlebotomus. ariasi*, em Portugal. Assinalado, a vermelho, as espécies comprovadamente vetoras no País (adaptado de Rioux, 1986, *fide* Afonso, 2015).

1.4 – Posição sistemática dos flebotomos (Diptera, Psychodidae)

A primeira descrição de flebotomíneos ocorreu em Itália, em 1786, por Scopoli, quando assinalou a espécie *Bibio papatasi*, tendo sido, posteriormente, alterada para *Phlebotomus papatasi* (Dedet *et al.*, 2003).

Quanto à posição sistemática dos flebotomos (Diptera, Psychodidae), estes, atualmente, apresentam a que se segue:

Filo - Arthropoda

Subfiló - Hexapoda

Classe - Insecta

Subclasse - Pterygota

Superordem - Endopterygota

Ordem - Diptera

Subordem - Nematocera

Família - Psychodidae

Subfamília - Phlebotominae

Gêneros (*)

Velho Mundo - *Phlebotomus* (**)*Sergentomyia**Idiophlebotomus**Australophlebotomus**Chinius*Novo Mundo - *Lutzomyia* (**)*Brumptomyia**Hertigia*

(*) - Principais gêneros

(**) - Gêneros com espécies vetoras de *Leishmania* spp. (Homem e/ou animal)

(Adaptado de Afonso, 2015).

Os insetos da subfamília Phlebotominae estão divididos em vários gêneros, sendo três encontrados no Velho Mundo: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius*, e três no Novo Mundo: *Brumptomyia*, *Lutzomyia* e *Warileya* (Young & Duncan, 1994). As espécies com importância médica pertencem aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, respectivamente no Velho e no Novo Mundo.

A posição sistemática da subfamília Phlebotominae (flebotomíneos) é baseada em caracteres morfológicos. Newstead, em 1911, fez a primeira divisão do grupo baseada nas nervuras das asas, e em 1914, agrupou as espécies tendo em conta a genitália masculina, fórmula dos palpos e antenas e, posteriormente, a determinação de índices morfométricos para definir as diferenças entre gênero e subgênero. As características morfoanatômicas das fêmeas, para a diferenciação das espécies, tais como a faringe, armadura bucal e espermatecas foram desenvolvidas por Adler e Theodor em 1926 (Newstead, 1911; Adler & Theodor, 1926).

1.5 – Principais características morfológicas externas dos flebotomos com importância médica e veterinária

Os flebotomos são insetos com metamorfoses completas, ou seja, o seu ciclo de vida apresenta ovos, larvas, pupas e adultos, diferentes de todos os outros estádios, sendo assim classificados como insetos holometabólicos (Figura 11). O ciclo desenvolve-se em dois meios distintos: os adultos, ou imagos, vivem em meio aéreo e as formas imaturas em meio terrestre. A duração de cada uma das fases é variável, dependendo da espécie, das condições climáticas, disponibilidade de alimento e fotoperíodo. O fenómeno de diapausa pode ocorrer quando as condições ambientais não são apropriadas, podendo retardar o desenvolvimento destes insetos (Munstermann, 2004; Oliveira, 2013).

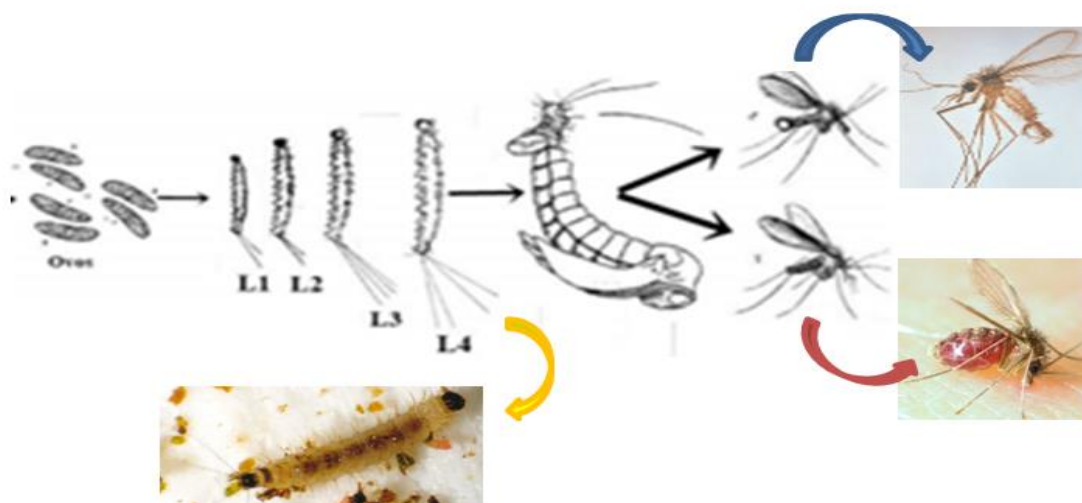


Figura 11 – Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae): aspectos morfológicos das fases imaturas (ovos, larvas e pupa) e imagos ou adultos (macho e fêmea) (adaptado de <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede/bitstream/tede2/4702/2/Luiz%20Augusto%20Franca%20Valenca.pdf> e de <http://www.parasitologia.icb.ufmg.br/defesas/331M.PDF>; acessado a 4 de agosto de 2016).

Durante a oviposição, as fêmeas flebotomíneas depositam ovos, apresentando, estes, um período de incubação cerca de dez a doze dias. Os ovos possuem uma forma elipsoide, de cor negra, medindo de 300 a 500 μm de comprimento e 70 a 150 μm de largura. Cada fêmea efetua posturas de trinta a setenta ovos (Brazil & Brazil, 2003;

Morales et al., 2005). As posturas são efetuadas em lugares escuros, em solo húmido mas não alagado, e com matéria orgânica, nomeadamente toca de roedores, grutas, galinheiros, coelheiras, buracos nos muros, termiteiras, entre outros.

A eclosão das larvas ocorre cinco a quinze dias após a postura. Estas, são vermiformes, apresentam uma coloração esbranquiçada, o tegumento tem sedas espinhosas, a cabeça é escura, bastante quitinizada, o corpo está dividido em doze segmentos, três torácicos e nove abdominais. O abdómen apresenta duas sedas caudais no primeiro estágio e quatro nos restantes. As larvas têm a capacidade de entrar em diapausa quando se verificam condições desfavoráveis à continuidade do ciclo de vida (Tesh, 1988; Pires, 2000).

O período de desenvolvimento pupal varia entre 10 a 20 dias. Estas possuem uma forma ligeiramente globosa, com cerca de 3 mm de comprimento, uma coloração esbranquiçada ou amarelada, tendendo a ficar mais escuras e acastanhadas antes da eclosão das formas adultas. Possuem o corpo dividido em cefalotórax e abdómen e os últimos segmentos abdominais apresentam a exúvia larvar do último estágio larvar. A passagem de ovo a adulto completa-se em aproximadamente 45 dias, dependendo das condições climáticas e ambientais (Antoine, 1994; Pires, 2000; Valença, 2015).

Os adultos apresentam dimorfismo sexual acentuado, através das genitálias e não das antenas, como acontece por exemplo, com os mosquitos que apresentam as duas formas de dimorfismo sexual, ou seja, genitálias e antenas diferentes. Morfologicamente, as principais diferenças entre machos e fêmeas encontram-se, então, ao nível dos últimos segmentos abdominais, que são modificados para constituir a genitália externa dos machos em forma de “garra”, adaptada para fixar as fêmeas durante a cópula e a fêmea apresenta um abdómen em forma de “cone”. As características morfológicas dos flebotomíneos adultos, e das diferentes espécies, podem distinguir-se por observação das estruturas das genitálias e das espermatecas. (Brazil & Brazil, 2003; Dantas-Torres, 2014).

1.5.1 – Bioecologia e ciclo de vida dos flebótomos

Ao contrário dos mosquitos (Culicidae), os flebótomos (Psychodidae, Phlebotominae) não necessitam de água para as fêmeas efetuarem as posturas. Assim, os ovos, larvas e pupas desenvolvem-se num meio considerado terrestre mas necessitando de alguma humidade, e os adultos/imagos encontram-se em meio aéreo (Figura 12) (Claborn, 2010).

Os machos e as fêmeas são fitófagos, necessitando de se alimentarem em sucos e açúcares vegetais, tais como seiva de plantas, néctar de flores e secreções de outros insetos. No entanto, as fêmeas são hematófagas, necessitando de efetuar refeições sanguíneas nos hospedeiros vertebrados, de modo a que se dê a maturação ovárica (Young & Duncan, 1994).

As fêmeas possuem um aparelho bucal picador-sugador que, ao picarem o hospedeiro vertebrado, dilaceram a derme e provocam um micro-hematoma, no qual sugam e ingerem o sangue. Este processo é designado por telmatofagia (*pool-feeding*) (Bates, 2007; Afonso & Alves-Pires 2008).

Os flebótomos adultos apresentam uma atividade crepuscular e/ou noturna, e o período de atividade, correspondendo à época sazonal, varia consoante a época do ano. No caso de Portugal, o referido período verifica-se durante os meses mais quentes do ano, entre maio e outubro/novembro. Contudo, com as alterações climáticas, com o aumento da temperatura média anual, com os invernos menos rigorosos, o ciclo de transmissão poderá sofrer um aumento sazonal devido a um maior número de gerações anuais e à maior abundância flebotomínica (Calheiros et al., 2006; Campino & Maia, 2010).

Quanto ao acasalamento dos flebotomíneos, pensa-se que ocorra durante o período noturno, devido, a estes terem uma maior atividade durante esse período. Este comportamento está relacionado com a vibração das asas e a presença de glândulas abdominais que libertam feromonas, que têm a capacidade de promover a atração entre os insetos (Brazil & Brazil, 2003).

A presença e a atividade do Homem, em determinadas áreas ou regiões, são importantes para a presença e disseminação dos flebótomos, pois muitas vezes dão origem a biótopos, tais como fendas em muros ou paredes, áreas com muita matéria orgânica, acumulações de madeiras, galinheiros, coelheiras, lixeiras, e outros, que são

locais propícios para estes insetos realizarem a postura e que servem de repouso e abrigo e, assim, promovem a continuação do desenvolvimento do ciclo biológico dos flebótomos. São fracos voadores, não conseguindo contrariar a velocidade do vento e apresentam voos de curtas distâncias, afastando-se, no máximo, um ou dois km dos seus locais de reprodução o que faz com que os flebótomos sejam não só vetores mas também os agentes focalizadores das leishmanioses (Afonso & Alves-Pires, 2008; Sharma & Singh, 2008).

Relativamente à bioecologia das formas imaturas, por sua vez, as larvas apresentam quatro estádios de desenvolvimento (LI a LIV), são saprófagas e fitófagas, desenvolvendo-se em locais húmidos e abrigados, fazendo a sua locomoção com o apoio das sedas ventrais. No quarto estágio, a larva deixa de se alimentar e vai procurar um local mais seco para pupar. As pupas não se alimentam e mantêm-se imóveis dando origem, posteriormente, à eclosão dos adultos.

Os flebótomos encontram-se em diversos habitats de regiões temperadas, tropicais e subtropicais. No Velho Mundo (Género *Phlebotomus*) encontram-se em zonas áridas, semi-áridas e húmidas (áreas urbanas, periurbanas, rurais e silváticas) e no Novo Mundo (Género *Lutzomyia*) distribuem-se por zonas silváticas, florestais, urbanas, periurbanas e rurais (Afonso & Alves-Pires, 2008; Helhazar, 2012).

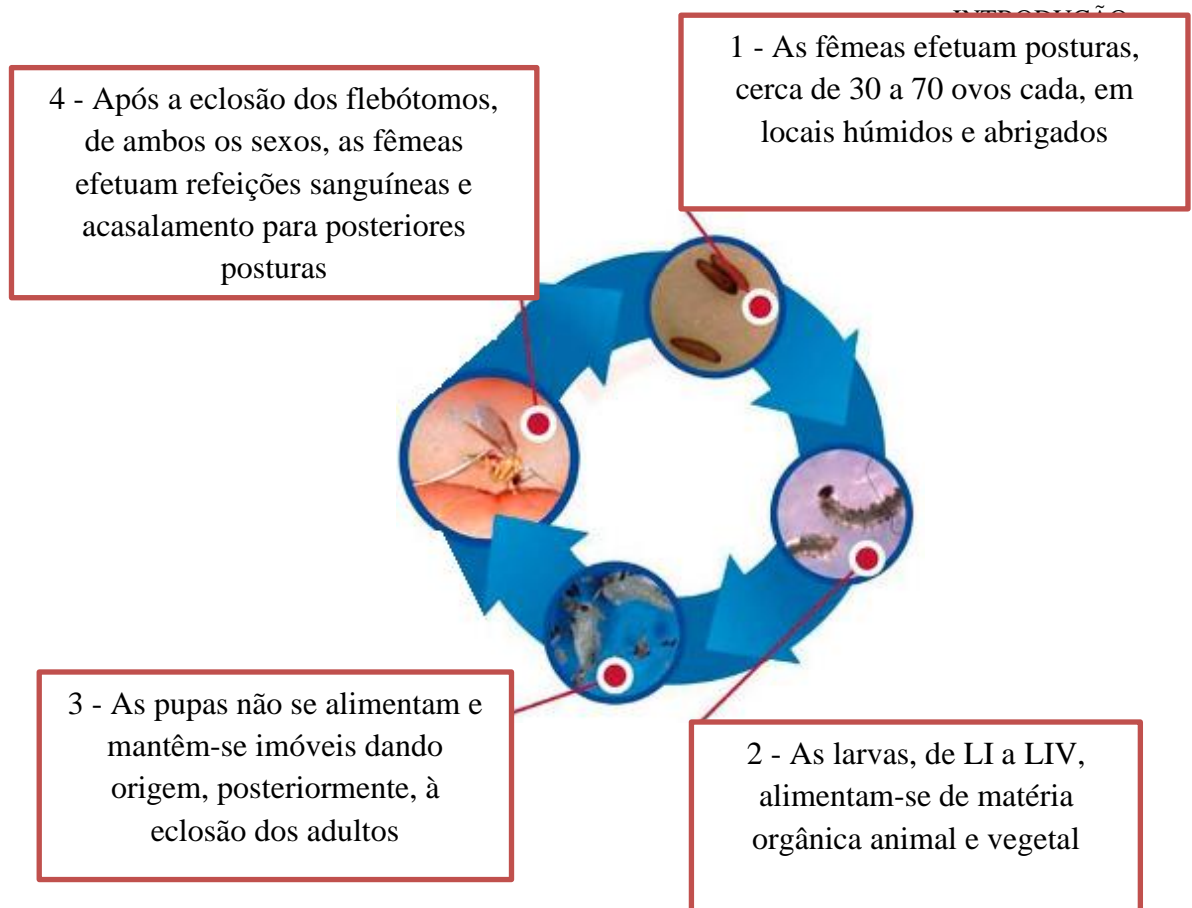


Figura 12 – Ciclo de vida dos flebotomíneos: fase terrestre (formas imaturas) e fase aérea (imagos ou adultos) (adaptado de <http://www.livredeparasitas.com/pt/parasitas-externos/tudo-sobre-parasitas-externos/flebotomos/>; acedido a 4 de agosto 2016).

1.5.2 – Desenvolvimento intravetorial de *Leishmania*, tipo e mecanismo de transmissão

O ciclo intravetorial de *Leishmania*, inicia-se quando um flebótomo fêmea, suscetível a este parasita, realiza uma refeição sanguínea num hospedeiro vertebrado que contenha macrófagos infetados com formas amastigotas do referido protozoário.

No vetor, o desenvolvimento do parasita ocorre no aparelho digestivo. As espécies de *Leishmania* do subgénero *Leishmania* têm um desenvolvimento suprapilárico, ou seja, na região abdominal do estômago, onde o sangue, contendo os parasitas, é rodeado pela membrana peritrófica. Algumas espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, subgénero *Viannia*, são parasitas peripiláricos, ou seja, os parasitas penetram no

intestino posterior antes de migrarem novamente para o estômago (Sacks, 2001; Laison & Shaw, 1987).

O tempo necessário para o desenvolvimento de *Leishmania*, em espécies flebotomínicas suscetíveis, é cerca de 6 a 9 dias, concluindo-se o processo da metacicloogénese, que corresponde ao desenvolvimento dos parasitas até às formas metacíclicas, que são as formas infetantes para o hospedeiro vertebrado. Além das formas infetantes, existentes na válvula estemodeal, no aparelho digestivo do vetor são encontradas outras formas, tais como as promastigotas procíclicas (curtas e ovóides, com um pequeno flagelo), nectomonas (flageladas, compridas e delgadas), leptomonas (curtas e que sofrem a 2^o multiplicação vetorial) e haptomonas (pequeno flagelo, não são móveis e formam um pequeno rolhão na válvula estemodeal). As fêmeas flebotomínicas encontram-se aptas a transmitir o parasita aos hospedeiros vertebrados após a formação das promastigotas metacíclicas. Estas formas metacíclicas (Figura 13), causam um bloqueio da válvula estemodeal do vetor, que durante a picada no hospedeiro vertebrado, são inoculadas por regurgitação (danos na válvula) e arrastadas pela saliva. Após a inoculação das formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro, estas serão fagocitadas pelos macrófagos, onde irão desenvolver-se num novo hospedeiro suscetível, quer se trate de um reservatório ou de um hospedeiro acidental (Afonso & Alves-Pires, 2008; Monteiro, 2012).

As alterações sofridas na válvula estemodeal favorecem a transmissão de duas formas distintas: por um lado a válvula danificada permite a regurgitação de formas metacíclicas na pele do hospedeiro cada vez que a fêmea se tenta alimentar, considerando-se ser esta a forma de transmissão, por picada, a mais usual, por outro, o flebótomo com a válvula danificada fica impossibilitado de realizar uma refeição sanguínea completa, pelo que irá efetuar um maior número de picadas na tentativa de se alimentar, sendo este aspeto um fator potenciador para a transmissão do parasita. Assim, é possível que apenas uma fêmea infetada e infetante, transmita o parasita, numa só noite, a vários hospedeiros vertebrados (Afonso & Pires-Alves, 2008; Branco, 2011).

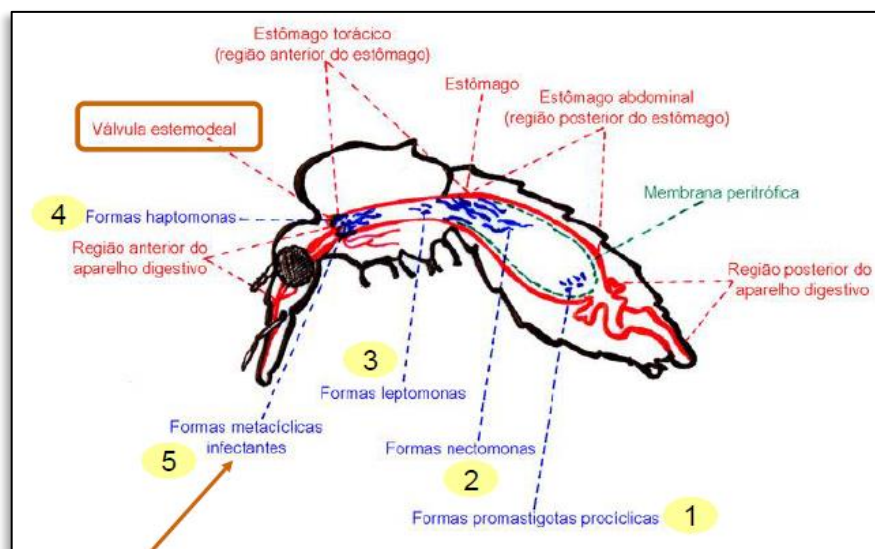


Figura 13 – Aparelho digestivo de flebotômico fêmea e desenvolvimento intravetorial de *Leishmania* sp. Assinaladas, com uma seta vermelha, as formas metacíclicas infectantes (5) que se localizam na válvula estomodeal do vetor (adaptado de Afonso & Alves-Pires, 2008).

1.6 – Principais aspetos da monitorização e vigilância flebotômica de uma região endêmica

Para efetuar a monitorização e a vigilância flebotômica de uma determinada região endêmica, devem ser considerados diferentes aspetos faunísticos e deve-se determinar vários parâmetros entomológicos, nomeadamente:

- Realizar capturas flebotômicas em diferentes biótopos (domésticos, peridomésticos e silváticos) em áreas urbanas, rurais e florestais (se for caso disso);
- Identificar as espécies capturadas;
- Determinar a distribuição e mapeamento das espécies;
- Determinar a abundância e a densidade flebotômica, total e por espécie;
- Determinar a variação sazonal;
- Determinar a fonte das refeições sanguíneas das fêmeas ingurgitadas;
- Determinar a infeção de flebotômicos por *Leishmania* spp.;
- Determinar a época de maior risco de transmissão do parasita;

- Relacionar as espécies capturadas com os tipos e variedades de biótopos prospectados;
- Relacionar as taxas de infecção vetorial com as prevalências das leishmanioses, humana e canina, nas áreas monitorizadas;
- Informar os serviços nacionais, regionais e locais;
- Divulgar os resultados obtidos, ao longo dos anos de estudo (Afonso et al., 2006; Baptista et al., 2007; Afonso, 2012).

1.7 – Aspetos da luta vetorial no controlo integrado das Leishmanioses

Para o controlo integrado das leishmanioses é necessária a avaliação da ocorrência da variação sazonal da fauna flebotomínica local, regional e nacional sendo importante o conhecimento da biologia e epidemiologia dos vetores, e o conhecimento das espécies de *Leishmania* encontradas quer nos vetores quer nos reservatórios/hospedeiros vertebrados. Estes aspetos, associados às características climáticas e ambientais, podem permitir a definição dos fatores de risco para a transmissão da doença (Pita-Pereira et al., 2005).

Nos últimos 10 anos, foram desenvolvidos avanços científicos no tratamento, prevenção e diagnóstico das leishmanioses, havendo uma redução no custo dos medicamentos para o tratamento, no caso da leishmaniose humana.

Tem-se verificado a implementação de estratégias nacionais e regionais e criado programas sustentáveis de controlo, como por exemplo no Brasil. Contudo, os programas em funcionamento ainda são escassos, e a mortalidade e morbilidade devido à leishmaniose, em todo o mundo, tem vindo a aumentar (OMS, 2010; 2012).

Em 2014, foi publicado um plano estratégico para o controlo da leishmaniose na região europeia 2014-2020, que tem como principal objetivo, até 2020, eliminar a mortalidade por LV, reduzir significativamente a morbilidade por doença visceral e cutânea, contribuir para melhorar o estado de saúde das populações em risco e minimizar os prejuízos socioeconómicos provocados pela doença em países onde a leishmaniose é um problema de saúde pública e animal (Ejov & Dagne, 2014).

Através de redes epidemiológicas nacionais e internacionais, como o Observatório Nacional de Leishmanioses (OnLeish) e o Leishrisk, tem sido possível coordenar outras

redes europeias de leishmaniose, permitindo, assim, a divulgação dos resultados mais relevantes obtidos através das atividades desenvolvidas pelas mesmas e promovendo a vigilância e o controlo desta parasitose a nível global.

O método mais eficaz para controlar doenças, cujos agentes patogénicos são transmitidos por artrópodes vetores, é reduzir o contacto Homem-vetor-reservatório.

A redução da densidade vetorial deverá ser uma estratégia vital no controlo das leishmanioses.

Atualmente, os principais métodos preconizados para o controlo dos vetores são:

- organoclorados (DDT), que continuam a ser utilizado em regiões mais pobres, devido ao seu baixo custo e elevada eficácia, ainda que apresente consequências nefastas para o meio ambiente;
- organofosforados e piretróides, este último de menor impacte ambiental;
- feromonas sintéticas para atração de flebótomos;
- coleiras impregnadas com inseticidas para cães, específicas para flebótomos;
- luta biológica através de bactérias como *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* e *Bacillus sphaericus*, fatais para as larvas flebotomínicas, podendo contribuir para a diminuição da densidade vetorial;
- produtos naturais locais, mais baratos, como o óleo de “neem” proveniente de sementes de *Azadirachta indica* e óleos de citronela, estes últimos testados na Etiópia;
- vacinação dos cães que representa, provavelmente, a melhor forma de controlar a LV humana. Contudo, uma vez que é dispendiosa, não é acessível à grande maioria dos proprietários;
- limpeza de áreas públicas, urbanas, periurbanas e habitacionais;
- higiene assídua dos canis, galinheiros, coelheiras, pocilgas, cavalariças e outros;
- construção de paredes e muros, sem buracos e pintados regularmente;
- ações educativas direcionadas para a comunidade, considerando os diferentes aspetos socioculturais e níveis de compreensão do público a ser sensibilizado;
- conhecimento dos proprietários de quintas, terrenos, casas com jardins e quintais, canis e outras propriedades, dos possíveis locais de postura/eclosão dos flebótomos e da sua importância em medicina humana e veterinária (Dye,

1996; Pires et al., 1997; Campos et al., 2005; Mendonça, 2011; Ready, 2013; Bates et al., 2015).

A “proteção individual”, que inclui o uso de repelentes, como por exemplo o N,N-dietil-3-metilbenzamida (DEET), que tem sido o mais usado em visitantes, turistas e trabalhadores que viajam para zonas endémicas de leishmaniose, e ainda o uso de materiais tratados com inseticidas, como vestuário, lençóis, redes mosquiteiras e cortinas, podem proteger os seres humanos das picadas infetantes de flebotómíneos e, assim, protege-los da doença (Ready, 2013).

1.8 – Objetivos

Objetivo geral:

- Caracterizar a fauna flebotomínica numa área urbana da cidade de Lisboa, não prospectada há mais de 70 anos, através da utilização de uma Estação flebotomínica com características socioeconómicas e bioecológicas importantes para um estudo de flebótomos, vetores de *Leishmania* sp.

Objetivos específicos:

- Capturar flebótomos (Diptera, Psychodidae), por armadilha miniaturizada tipo CDC, em área urbana da região de Lisboa, em local já previamente contactado e autorizado pelo proprietário, mas ainda não estudado anteriormente;
- Identificar morfologicamente as diferentes espécies flebotomínicas capturadas;
- Determinar a distribuição, a abundância relativa e a densidade sazonal, durante o período de atividade flebotomínica;
- Relacionar a influência das fases lunares com a densidade flebotomínica;

INTRODUÇÃO

- Determinar os fatores de risco para a presença de espécies flebotomínicas, vetoras de *Leishmania*, na área prospectada, e relacionar com os aspetos bioecológicos presentes;
- Determinar o grau de rotação da genitália externa dos machos capturados e relacionar com a proximidade, ou não, de locais de postura;
- Determinar a taxa de infeção por *Leishmania* das fêmeas capturadas, através de técnicas de biologia molecular (PCR);
- Determinar a taxa de infeção por endoparasitas não *Leishmania*;
- Determinar a taxa de infestação por ectoparasitas dos flebótomos capturados;
- Determinar as diferentes fontes de refeições sanguíneas das fêmeas capturadas ingurgitadas, por técnicas de biologia molecular (PCR);
- Contribuir para o esclarecimento dos aspetos bioecológicos dos flebótomos e da transmissão vetorial de leishmaniose no Concelho de Lisboa e relacionar com outras regiões endémicas.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Caracterização da área de estudo

Lisboa, capital de Portugal, fica situada no extremo Sudoeste da Europa, banhada pelo Rio Tejo, à latitude de 38°42' N e longitude de 09°10' O. Encontra-se junto ao Oceano Atlântico e numa grande área que poder-se-á dizer que tem *um pé em África e outro na Europa*, o que lhe confere características únicas no que diz respeito à biodiversidade, tornando-a bastante diferente de outras cidades europeias (CML, 2012).

A capital de Portugal, integra a Área Metropolitana de Lisboa (AML), uma associação de 18 municípios abrangidos pelas unidades territoriais definidas com base na Nomenclatura das Unidades Territoriais para Fins Estatísticos (NUTS III) da Grande Lisboa e da Península de Setúbal. O concelho de Lisboa tem uma área de 83,84 km², o que representa 0,1% do território nacional.

A cidade coincide com as fronteiras do concelho e é composta por 24 freguesias, Belém, Ajuda, Alcântara, Benfica, São Domingos de Benfica, Alvalade, Marvila, Areeiro, Santo António, Santa Maria Maior, Estrela, Campo de Ourique, Misericórdia, Arroios, Beato, São Vicente, Avenidas Novas, Penha de França, Lumiar, Carnide, Santa Clara, Olivais, Campolide e Parque das Nações (Figura 14) (DRE, 2012), fazendo fronteira a Norte com o concelho de Loures, a Noroeste com Odivelas e Amadora e a Oeste com Oeiras. Através do estuário do Rio Tejo, o maior da Península Ibérica, com cerca de 19 km de extensão, Lisboa une-se aos concelhos da Margem Sul: Almada, Seixal, Barreiro, Moita, Montijo e Alcochete (Pereira, 2012).

A freguesia de Alcântara, onde estava situada a Estação flebotomínica deste estudo, integra, em quase metade da sua área, uma mancha verde: parte do Parque Florestal de Monsanto e a Tapada da Ajuda. Localiza-se em Lisboa Sul, tendo uma latitude de 38° 42' 33'' N e longitude de 9° 10' 27'' O. Ocupa uma área de 4,40 km², o que corresponde a 5,22% do território do concelho de Lisboa (CML, 2016).

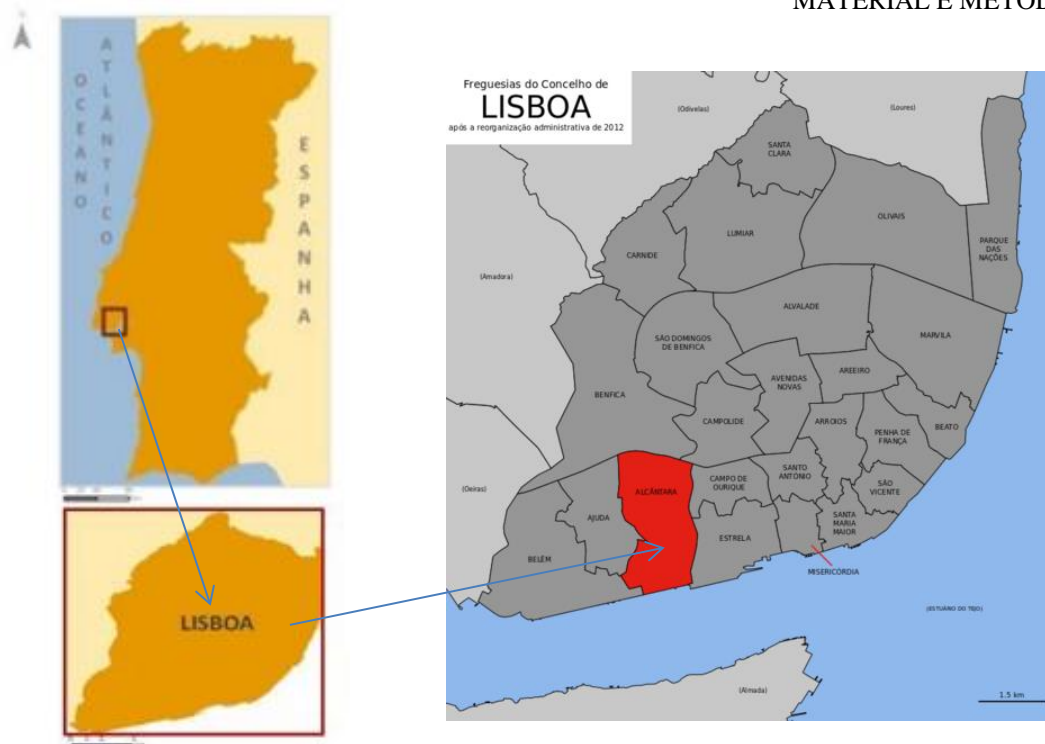


Figura 14 – Mapa de Portugal, com a localização de Lisboa e suas freguesias, com destaque para área de estudo: Freguesia de Alcântara ($38^{\circ} 42' 33''$ N - $9^{\circ} 10' 27''$ O), representada a vermelho, no mapa à direita (adaptado de CML, 2016).

2.1.1 – Demografia

Lisboa é a cidade mais populosa de Portugal, com cerca de 547 mil habitantes, em 2011, de acordo com os dados provisórios do último recenseamento geral da população, realizado pelo Instituto Nacional de Estatística (INE, 2013). A cidade tem assistido a um rápido decréscimo da sua população, tendo em 2011 cerca de um terço a menos dos habitantes que tinha em 1981.

Relativamente à área de estudo, a freguesia de Alcântara é habitada por 13.943 pessoas, correspondente a 2,55% dos habitantes do concelho (INE, 2013).

2.1.2 – Hidrologia

A Sub-Bacia Hidrográfica de Alcântara localiza-se na província portuguesa da Estremadura, no concelho de Lisboa, na margem direita do Rio Tejo, e estende-se por uma área de 18 km^2 , que abrange as freguesias de Alcântara, Ajuda, Benfica, Buraca, Campolide, Carnide, Damaia, Lumiar, Pontinha, Prazeres, Santa Isabel, Santo Condestável, São Domingos de Benfica e Venda Nova (CML, 2012). Esta Sub-Bacia,

integra parte da Bacia Hidrográfica do Rio Tejo, e ocupa parte da área oeste do concelho de Lisboa.

2.1.3 – Geologia

Com base na Carta Geológica do concelho de Lisboa (1986), à escala 1:10000, dos Serviços Geológicos de Portugal, com nomenclatura e simbologia da 2.^a Edição da Carta Geológica de Portugal, à escala 1:50000, de 2005, é possível proceder a uma interpretação da tipologia dos solos deste concelho. Foram considerados seis classes de tipos de solos, nomeadamente aluvionares, arenosos, argilosos, basálticos, calcareníticos e carbonatados, de acordo com a textura e composição de cada formação geológica (SGP, 1992). Na zona Sudoeste, predominam os solos basálticos e carbonatados, associados às formações cretácicas carbonatadas e vulcano-sedimentares. A restante área é constituída pela alternância de solos arenosos, argilosos e calcareníticos. Os solos aluvionares restringem-se à faixa litoral e às linhas de água (vales) (CML, 2012).

Os terrenos mais antigos, cujos principais afloramentos se encontram nas zonas de Monsanto, Ajuda e Vale de Alcântara, são predominantemente constituídos por calcários, calcários margosos e margas, representando a grande transição marinha, do Cretácico Superior (97-91 Ma). A base da coluna litostratigráfica da área em estudo, contém rochas do Cretácico Superior, seguidas pelo Paleogénico e o Neogénico no topo (Pais et al., 2006).

2.1.4 – Clima

A localização da cidade de Lisboa, tal como foi referido, é à beira do estuário do Tejo e próxima do Oceano Atlântico mas, simultaneamente, encontra-se protegida pela Serra de Monsanto a Ocidente, pelas elevações que constituem a Serra da Carregueira a Noroeste, e pela Serra de Sintra, conferindo, assim, características peculiares ao seu clima (Alcoforado, 1988). Apresenta, então, um clima de tipo mediterrânico, caracterizado por verões quentes e secos, e invernos húmidos e chuvosos. De acordo com o Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), os dados climáticos apresentados são baseados na normal climatológica do período 1971-2000, caracterizando o clima da cidade de Lisboa.

2.1.4.1 – Temperatura

A Temperatura média anual apresenta um valor na ordem dos 17°C, as temperaturas mínimas encontram-se nos meses de dezembro a fevereiro, em média, 9°C, e as temperaturas máximas ocorrem durante os meses de julho a setembro, em média 27°C (IPMA).

2.1.4.2 – Precipitação e Humidade

Os valores médios anuais de precipitação são da ordem dos 650 mm aos 760 mm, sendo os meses de novembro a abril os de maior precipitação (em média 104 mm mensais), e os meses de julho e agosto os que apresentam menor valor (valores médios mensais de 6,5 mm) (IPMA).

As situações de nevoeiro ocorrem, especialmente, nos meses de dezembro e janeiro, por oposição ao período de verão. A nebulosidade durante todo o ano, com maior intensidade durante o período de inverno, regista 10 a 15 dias por mês com uma nebulosidade de índice 8 (num intervalo compreendido entre 0 a 10) (IPMA).

2.1.4.3 – Ventos Dominantes

Os ventos predominantes são: os de Norte durante a época de verão, ventos de Nordeste na estação de inverno e ventos de Sudoeste, Oeste e Noroeste durante as estações intermédias (IPMA).

2.1.5 – Coberto Vegetal

A vegetação natural de Lisboa encontra-se representada por matas e prados. Nos olivais, hortas, pomares e nas quintas de recreio, encontram-se as espécies representativas da flora cultural. Ocorrem também pés espontâneos de carvalho-negral (*Quercus pyrenaica*), ulmeiro (*Ulmus minor*), abrunheiro (*Prunus spinosa subsp. insititoides*), carrasco (*Quercus coccifera*) e zambujeiro (*Olea europaea var. sylvestris*) (CML, 2015). A cidade é conhecida pelo elevado número de jardins botânicos e outros espaços de coleções vegetais, e mesmo as quintas urbanas e os jardins apresentam uma diversidade significativa de espécies. A própria imagem

“exótica” de Lisboa deve muito a espécies como Jacarandá (*Jacaranda ovalifolia*), Tipuana (*Tipuana tipu*), Pinheiro-de-norfolk (*Araucaria heterophylla*), Palmeira-das-canárias (*Phoenix canariensis*) e Dragoeiro (*Dracaena draco*), entre outras (CML, 2015).

2.1.6 – Fauna

Encontram-se referenciadas no concelho de Lisboa, 29 espécies de mamíferos, sendo 26 autóctones, uma exótica (saca-rabos, *Herpestes ichneumon*) e duas de origem feral, cão e gato (*Felis silvestris catus*). De salientar que a maioria das referências existentes são relativas ao Parque Florestal de Monsanto e outras matas, tais como: coelho-bravo, rato-do-campo, musaranho, toupeira, esquilo-vermelho, ouriço-cacheiro, saca-rabos, gineta e raposa. No entanto, dadas as características e preferências de habitat das espécies, muitas podem-se considerar como prováveis também no mosaico urbano, nomeadamente gato, cão, ratazana-preta (*Rattus, Rattus*), ratazana-comum (*Rattus norvegicus*), rato-doméstico (*Mus musculus*) e morcego (*Chiroptera*) (CML, 2015).

Encontram-se referenciadas 19 espécies de répteis (sendo 17 autóctones). Quase todas estas espécies estão confinadas ao Parque Florestal de Monsanto e outras matas ou parques (sardão, cobras, sapos, cágados, salamandras), mas foi ainda possível validar a presença das mesmas, em habitats do “mosaico urbano”, tais como a lagartixa (*Podarcis hispanica*), rã (*Rana perezi*) e osga (*Tarentola mauritanica*) (CML, 2015).

Verificam-se espécies de aves referenciadas para Lisboa, num total de 191, incluindo 21 exóticas, duas acidentais e duas domésticas. As mais comuns são:

- Em zonas edificadas: andorinha (Família Hirundinidae), coruja-das-torres (*Tyto alba*), estorninho-malhado (*Sturnus vulgaris*), pardal-comum (*Passer domesticus*), pombo-das-rochas (*Columba livia*);
- Em parques, jardins e baldios: alvéola-branca (*Motacilla alba*), carriça (*Troglodytes troglodytes*), chamariz (senirus senirus), melro-preto (*Turdos merula*), periquito-de-colar (*Psittacula krameri*), pintassilgo (*Carduelis carduelis*), pisco-de-peito-ruivo (*Erithacus rubecula*).
- Em zona florestal, como Monsanto e outras matas: chapim-preto (*Parus ater*), chapim-real (*Parus major*), estorninho-preto (*Sturnus unicolor*), gaio (*Garrulus*

glandarius), mocho-galego (*Athene noctua*), perdiz (*Alectoris rufa*), tentilhão-comum (*Fringilla coelebs*);

- Junto às margens do rio Tejo: andorinha-do-mar-anã (*Sternula albifrons*), corvo-marinho-de-faces-brancas (*Phalacrocorax carbo*), gaivota-argêntea (*Larus michahellis*), garajau (*Sterna sandvicensis*), guincho-comum (*Chroicocephalus ridibundus*), pato-real (*Anas platyrhynchos*), gaivina-preta (*Chlidonias niger*), pilrito-sanderlingo (*Calidris alba*), garça-real (*Ardea cinerea*) e cegonha (*Ciconia*).

2.2 – Estação flebotomínica escolhida: Freguesia de Alcântara, Concelho de Lisboa, Distrito de Lisboa

A Estação flebotomínica de Alcântara, Lisboa, insere-se numa área urbana, localizada numa das freguesias da capital, constituída por duas vivendas, com jardins e piscina, abrangendo uma área total de 1.746,6 m² e apresentando as seguintes coordenadas: Casa 1 – Latitude 38° 41' 46'' N, Longitude 9° 10' 46'' O e altitude 38,66 m; Casa 2 – Latitude 38° 42' 9'' N, Longitude 9° 11' 1'' O e altitude 94,12 m. As casas são contíguas, separadas por um pequeno muro e ligadas através de um portão que se mantém, na maior parte das vezes, aberto. Encontra-se nas traseiras do IHMT, próxima do Centro de Congressos, do Porto de Lisboa e do Rio Tejo (Figura 15).

A casa 1 é contituída por uma vivenda, jardim, piscina, que tem uma casa das máquinas, um canil onde se encontram dois cães e um local para churrasqueira. A casa 2 é uma vivenda, com um aviário (casa das aves onde habitam diversas aves exóticas: caturras e piriQUITOS), um canil (um cão), árvores de fruto e jardim.

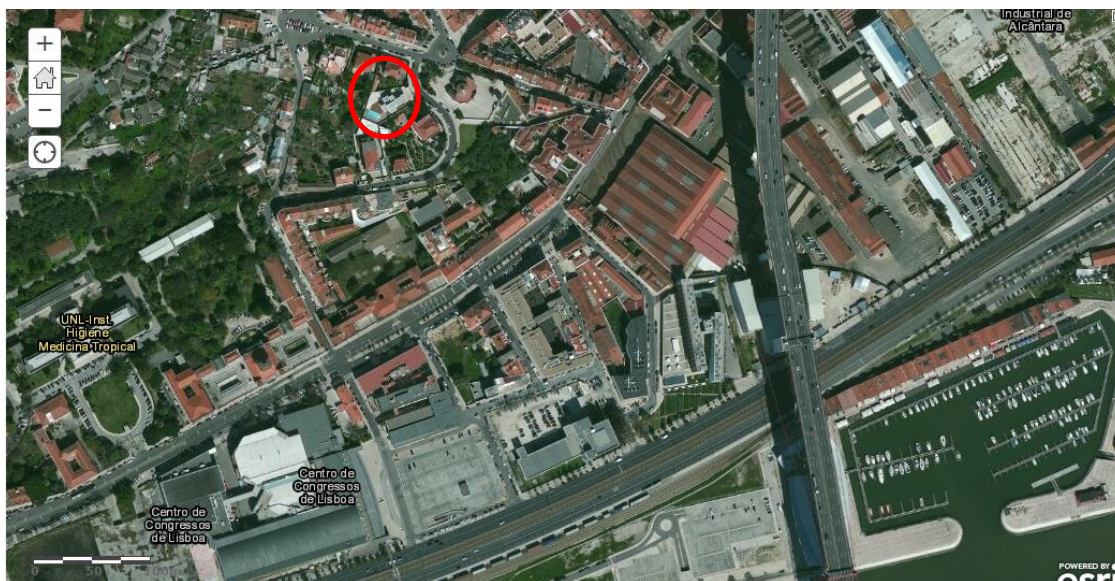


Figura 15 - Estação flebotomínica de Alcântara, assinalada com um círculo vermelho, correspondendo a uma área urbana da freguesia de Alcântara, Lisboa, 2015. No canto inferior esquerdo, observa-se o IHMT e o Centro de Congressos, à direita uma marina e o Rio Tejo (adaptado de:

<https://www.arcgis.com/home/webmap/viewer.html?webmap=7ec08e5438304dbfa1e26181503e6fa8>; acedido a 25 de abril de 2016).

A área estudada foi escolhida, como Estação flebotomínica, uma vez que os proprietários das referidas casas, comunicaram-nos que além de serem picados, à noite, por dípteros de pequenas dimensões (2-3 mm de comprimento), tinham tido cães com leishmaniose, diagnosticada quer por exame clínico, realizado por médicos veterinários, quer laboratorialmente, e que nunca tinham ido para outras áreas do País. Assim, dadas as características dos jardins envolventes e ao historial referido, achou-se pertinente desenvolver este estudo flebotomínico, numa área em que já o Professor Doutor Fraga de Azevedo, há mais de sessenta anos, verificou ser um foco de leishmaniose humana e canina, tendo estudado também os seus vetores (Azevedo, 1946).

2.2.1 – Captura de Flebótomos (Diptera, Pshychodidae)

A captura de flebótomos, para a realização deste estudo, realizou-se na referida e caracterizada Estação flebotomínica de Alcântara. Os proprietários foram informados sobre a importância do estudo e sobre todos os procedimentos que seriam executados,

nomeadamente quais os locais (biótopos) que seriam prospetados, como funcionavam as armadilhas para captura de insetos e os horários de colocação e recolha das CDC. Deste modo, foi pedido o consentimento dos proprietários, os quais se disponibilizaram totalmente para colaborar na procura dos diferentes tipos e variedades de biótopos, após terem sido informados dos principais objetivos do estudo e comportamento geral dos insetos a pesquisar.

2.2.2 - Período de prospeção, método de captura e conservação do material

As capturas foram realizadas de 27 de maio a 10 de novembro de 2015, efetuando-se, no total, 52 dias de capturas, durante 3 a 4 noites consecutivas por semana, e utilizando-se, durante o período de prospeção flebotomínica, 208 armadilhas luminosas CDC (Center for Disease Control) de modo a capturar flebótomos em bom estado de conservação, para pesquisa de ADN de *Leishmania* sp. e pesquisa de ADN de hospedeiros vertebrados em que as fêmeas ingurgitadas tivessem realizado refeições sanguíneas.

As armadilhas utilizadas (Figura 16) são compostas por uma estrutura metálica onde se insere um sistema elétrico ligado a uma fonte luminosa (lâmpada de 6V e 60mA), que atrai os insetos que apresentam fototropismo positivo, como é o caso dos flebótomos, e uma ventoinha que os aspira para uma gaiola de rede de Nylon de malha fina, com 18 mm de aresta, fixa à armação metálica. Na zona lateral da estrutura existe um suporte onde se colocam as pilhas (recarregáveis) que permitem o funcionamento consecutivo por mais de 24 horas e, entre a ventoinha e a gaiola de Nylon, para evitar a passagem de insetos de maiores dimensões, colocou-se uma rede metálica de malha quadrada de 1cm². Para as pilhas recarregáveis utilizaram-se carregadores Duracell® Accu Recharger.

As armadilhas CDC são eficazes na atração de flebótomos num raio de dois metros e foram colocadas, no máximo, a 1,5 metros do solo (Pires, 2000; Branco, 2011).

Utilizaram-se caixas isotérmicas com acumuladores a -4°C para transportar as gaiolas, devidamente etiquetadas, com os insetos capturados, desde o local de captura até ao laboratório da Entomologia Médica, no IHMT. As gaiolas, como os insetos, eram colocadas numa arca a -20°C, durante cerca de 5 minutos, os quais acabavam por morrer

pela ação do frio. Seguidamente, eram aspirados com o auxílio de um aspirador elétrico manual (*Hausherr's Machine Works*) e colocados em tubos de plástico com álcool 90%, devidamente rotulados (nº do biótopo/local/data), e guardados, no escuro, à temperatura existente no laboratório (23°C).



Figura 16 – Armadilha luminosa miniaturizada tipo CDC e respetiva gaiola, utilizada na captura de flebotomos na Estação flebotomínica de Alcântara, Lisboa, 2015 (fotografia de S. Gouveia, 2015).

2.2.3 – Biótopos prospetados

2.2.3.1 – Divisão e caracterização dos vários tipos e variedades de biótopos

Os biótopos, para captura de flebotomos adultos, variam de acordo com fatores climáticos e ambientais, tais como a temperatura, humidade relativa, velocidade do vento, luminosidade, composição dos solos, existência de terrenos húmidos e matéria orgânica, para abrigo e postura das fêmeas, e a distribuição de espécies animais e de plantas (Oliveira et al., 2010; Aguiar & Medeiros, 2003; Branco et al., 2013).

Ao seleccionar a área de capturas flebotomínicas, houve o cuidado de escolher biótopos abrigados e evitar áreas próximas de luzes artificiais ou sítios expostos ao vento.

Para cada biótopo e por cada armadilha colocada, foram registados, na ficha de campo (Anexo 1), as coordenadas (GPS), as condições climáticas, a vegetação dominante, a composição da fauna presente até 20 metros e todas as observações consideradas pertinentes. Efetuou-se igualmente o registo fotográfico (XPERIA, Sony Ericsson type CBA 0002025, 2013, China).

Dividiu-se o tipo de biótopos em domésticos e peridomésticos. Nos domésticos, as armadilhas foram colocadas em sítios diretamente associados às habitações humanas, como a churrasqueira, a casa das máquinas da piscina e outros. No que diz respeito aos biótopos peridomésticos, estes corresponderam a sítios em que as armadilhas foram colocadas mais afastadas das habitações humanas e que constituíam abrigos de animais, como por exemplo, o aviário (casa das aves).

- Biótopos Domésticos:

- Churrasqueira/exterior (Figura 17 - 1) corresponde ao local, junto à casa 1, onde, para além de funcionar, por vezes, como churrasqueira, se armazenava lenha;
- Casa das máquinas/entrada/exterior: entrada para a casa das máquinas da piscina, num local abrigado, junto à parede (Figura 17 - 2);
- Casa das máquinas/tubos/interior: andar de baixo da casa das máquinas da piscina, junto às tubagens e com porta aberta para o exterior (Figura 17 - 3).



Figura 17 – Biótopos: domésticos, variedades dos mesmos e peridoméstico: 1- Churrasqueira/exterior, pertencente à casa 1; 2 - Casa das máquinas/entrada/exterior; 3 - Casa das máquinas/tubos/interior; 4 - Aviário (fotografia de S. Gouveia, 2015).

- Biótopos Peridomésticos:

Na casa 2 - Abrigo de aves exóticas/exterior (aviário): local onde se encontravam aves exóticas (caturras e piriQUITOS), semi-aberto, com acesso ao jardim, com plantas ornamentais, relva e algumas árvores de fruto (citrinos).

2.2.3.2 – Elaboração e utilização de Ficha de Campo

Efetuiu-se uma ficha de campo (Anexo) adaptada à área de estudo (região urbana – Estação flebotomínica de Alcântara, Lisboa) e adaptada de Branco (2011). Durante a captura de flebotomíneos foram registados, na ficha de campo, os dados referentes a cada biótopo, num raio de 20 metros à volta da armadilha CDC.

Na ficha de campo registaram-se os seguintes parâmetros:

- A localização da Estação flebotomínica, incluindo localidade e coordenadas - latitude, longitude e altitude, registadas com um GPS portátil (N-Drive® G800, software Navigon);
- O número do biótopo e nome do coletor;
- A data e hora da colocação da armadilha CDC, bem como a hora da recolha e a duração total do tempo de captura;
- O método de captura (armadilha luminosa CDC) e o registo fotográfico do biótopo;
- O tipo de formação superficial e características fitogeográficas;
- O sítio/local de captura – variedade de biótopo;
- Animais existentes e quantidade dos mesmos num raio de 20 metros à volta da armadilha;
- Presença/ausência de cães com coleiras inseticidas para flebótomos;
- Existência/ausência de cães vacinados contra a leishmaniose;
- A temperatura e a humidade relativa existentes no biótopo à hora de colocação da armadilha CDC e à hora de recolha da mesma, medidas com um termo-higrómetro digital portátil (TFA, Dual);
- O vento, no local prospetado na altura da colocação e da recolha da armadilha CDC, utilizando-se um anemómetro (m/s) (Mini Anemometer, Anemometer MS 82, NO 11030095);
- Fases da Lua;
- Presença/ausência (+/-) de flebótomos no biótopo, aquando da recolha.

2.3 – Identificação morfológica dos flebótomos capturados

Os exemplares que se encontravam em tubos com álcool (90%), e à temperatura ambiente, 23° C (ar condicionado do laboratório de Entomologia Médica), devidamente etiquetados com o número do respetivo biótopo, foram, inicialmente, separados, diferenciando-se os flebótomos de outros artrópodes capturados.

De modo a separar os flebotomíneos por sexo, estes foram transferidos, com o auxílio de uma pipeta de plástico, para uma placa de Petri, observando-se ao estereomicroscópio, e a uma ampliação de 12x. Após observação morfológica das genitálias externas, os machos e as fêmeas foram colocados, separadamente, em tubos de plástico, também com álcool a 90% e etiquetados, com o nº de biótopo, data da captura e registo do sexo (Figura 18). Todos os dados foram sempre registados no caderno de laboratório, por número de biótopo.



Figura 18 – Os flebotomíneos machos e fêmeas foram separados ao estereomicroscópio. As fêmeas, após disseção dos últimos segmentos abdominais, e identificação ao microscópio ótico, foram colocadas em tubos de Eppendorf, com soluto tampão de lise, e devidamente etiquetados, para posterior análise molecular (seta vermelha) (fotografia de S. Gouveia, 2015).

2.3.1 – Identificação morfológica das espécies flebotomínicas: machos

Para a identificação das espécies flebotomínicas correspondentes aos machos capturados, recorreu-se a chaves dicotómicas para as espécies assinaladas em Portugal, de acordo com Branco (2011).

Os exemplares machos, de cada biótopo, e de cada tubo, foram transferidos, com uma pipeta de plástico, do tubo de plástico correspondente, para uma placa de Petri, contendo álcool a 90% e, de seguida, e individualmente, para um godé de vidro contendo também álcool 90%. Observaram-se ao estereomicroscópio com uma ampliação de 56x e identificaram-se morfológicamente as estruturas das genitálias externas. Foram anotadas as espécies, de cada biótopo, no caderno de laboratório, contados e novamente colocados nos tubos, com álcool a 90%, devidamente etiquetados, para posteriores estudos.

Observaram-se as genitálias externas em posição lateral, ou posterior, de modo a obter-se a posição correta para a visualização das características morfológicas do gonocoxito, gonostilo, espinhas a diferentes níveis e espessuras, edeago ou pénis, parâmeros, lobos laterais e existência/ausência de lobo basal. O grau de rotação da genitália externa dos machos (total, parcial, ou não rodado) foi também anotado por espécie.

2.3.2 – Identificação morfológica das espécies flebotomínicas: fêmeas

Relativamente à identificação morfológica das fêmeas, de diferentes espécies, esta foi baseada na morfologia (forma e segmentação) das espermatecas, seguindo as chaves dicotómicas de Branco (2011).

As fêmeas flebotomínicas foram retiradas do tubo de plástico, correspondente a um determinado número de biótopo, com a ajuda de uma pipeta de plástico, para uma placa de Petri contendo álcool a 90%. Com o auxílio de uma pinça entomológica colocou-se individualmente cada fêmea, em posição lateral, no centro de uma lâmina de vidro onde se colocou, numa das extremidades, uma gota de soluto de Marc-André (soluto esclarecedor). Procedeu-se à dissecação dos três últimos segmentos abdominais de cada fêmea, fazendo-se um corte transversal com o auxílio de dois estiletos esterilizados à chama de uma lamparina. Seguidamente, e com uma pinça esterilizada,

da mesma forma, colocou-se a restante parte da fêmea flebotomínica num tubo Eppendorf de 1,5 ml com 50 µl de tampão de lise (Cell Lysis Citomed, Citogene, Lisboa, Portugal), devidamente identificado (nº do biótopo e nº da fêmea) e armazenado no congelador a -20°C, para posterior extração de ADN (descrito no ponto 2.5.1). Cada tubo foi numerado com o mesmo número que se anotou no caderno de laboratório.

Na gota de soluto de Marc-André, onde já se encontravam os três últimos segmentos abdominais da fêmea, para esclarecimento, colocou-se uma microlamela e observou-se a lâmina ao microscópio ótico, com ampliações de 125x, 312x e 500x. Através da chave dicotómica de Branco (2011), procedeu-se à identificação morfológica das espécies, por observação das características das espermatecas, nomeadamente anéis do corpo, canais condutores, extremidade basal, existência/ausência de bolbo na região basal, espermateca tubular de paredes lisas, e outras, e fazendo-se o registo fotográfico das mesmas com o auxílio do programa *Analysis getIT* (Figura 19).

Durante a identificação das espécies flebotomínicas fêmeas, registaram-se também os estados alimentares (completamente alimentadas; parcialmente; sangue muito digerido e não alimentadas), a presença ou ausência de ovos no abdómen (grávidas/não grávidas), malformações nas espermatecas, presença de ectoparasitas (ácaros ou outros) e endoparasitas (nemátodes ou outros).

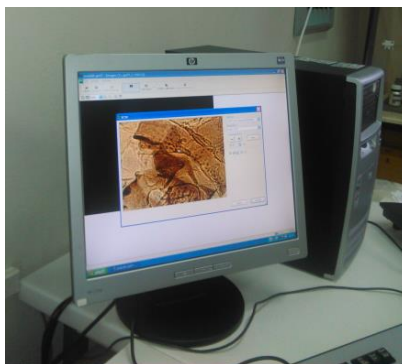


Figura 19 – Observação - identificação; registo fotográfico das espermatecas das diferentes espécies flebotomínicas capturadas (fotografia de S. Gouveia, 2015).

2.4 – Parâmetros bioecológicos determinados

2.4.1 – Espécies flebotomínicas capturadas

Após a identificação das espécies, determinaram-se vários parâmetros com importância para o estudo bioecológico da Estação flebotomínica, em área urbana da cidade de Lisboa, e que permitiriam também atualizar o conhecimento faunístico de uma região da cidade que não era estudada há mais de setenta anos (Azevedo, 1946).

2.4.2 – Determinação da abundância relativa das espécies

A abundância relativa das espécies é determinada a partir do número de exemplares capturados de uma determinada espécie flebotomínica, sobre o número total de exemplares capturados das várias espécies, a multiplicar por cem (%).

2.4.3 – Razão dos sexos dos exemplares capturados

A razão dos sexos corresponde ao número total de machos a dividir pelo número total de fêmeas. A razão dos sexos por espécie foi igualmente determinada.

2.4.4 – Número de fêmeas alimentadas e grávidas

A proporção de fêmeas alimentadas/grávidas corresponde ao número de fêmeas flebotomínicas alimentadas/grávidas, sobre o número total de fêmeas capturadas, a multiplicar por cem (%).

2.4.5 – Determinação do grau de rotação da genitália dos machos, total e por espécie flebotomínica

Corresponde ao número total de flebotomíneos machos com a rotação da genitália externa parcialmente ou não rodadas, a dividir pelo número total de flebótomos machos, a multiplicar por cem (%). O grau de rotação foi também determinado por espécie.

2.4.6 – Determinação da taxa de infestação de flebotomíneos por ectoparasitas

A taxa de infestação de flebotomíneos por ectoparasitas corresponde ao número de flebotomíneos com ectoparasitas presentes, sobre o número total de flebótomos capturados, a multiplicar por cem (%).

2.4.7 – Determinação da taxa de infecção de flebotomíneos por endoparasitas não *Leishmania*

A taxa de infecção de flebotomíneos por endoparasitas não *Leishmania*, por exemplo – nemátodes, é igual ao número flebótomos fêmeas dissecadas (observação ao microscópio ótico) infetadas por endoparasitas não *Leishmania*, a dividir pelo número total de flebótomos fêmeas capturadas, a multiplicar por cem (%).

2.4.8 – Número de flebotomíneos capturados por tipo, e variedade de biótopos prospectados

Tipo doméstico e peridoméstico: corresponde ao número de flebotomíneos capturados por tipo de biótopo prospectado a dividir pelo número total de flebótomos capturados, a multiplicar por cem (%).

Variedade de biótopos: número de flebotomíneos capturados por variedade de biótopo prospectado a dividir pelo número total de flebótomos capturados, a multiplicar por cem (%).

2.4.9 – Determinação da densidade flebotomínica por espécie e por meses de captura

A densidade flebotomínica por espécie: corresponde ao número de exemplares capturados de uma determinada espécie flebotomínica, por armadilha CDC, noite.

Densidade flebotomínica por meses de captura/variação sazonal: número total de flebotomíneos de uma determinada espécie, capturados durante um determinado mês de atividade flebotomínica, por armadilha, noite.

2.4.10 – Influência das fases lunares nas densidades flebotomínicas

A influência das fases lunares é determinada a partir do registo das fases lunares existentes nos dias/meses de captura, relacionando estas com as densidades totais flebotomínicas durante as referidas fases, mais especificamente Lua Nova (LN) e Lua Cheia (LC).

2.5 – Análise Molecular

O método molecular considerado mais sensível e específico é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), estando dependente dos *primers*, do número de cópias da sequência alvo, do método de extração de ADN, do produto biológico utilizado e do protocolo de PCR (Maia *et al.*, 2009; Alvar *et al.*, 2004; Cortes *et al.*, 2004).

A técnica de PCR muito utilizada e aceite como método de diagnóstico de várias doenças infecciosas, incluindo para o agente patogénico *Leishmania*, um vez que deteta parasitas numa grande variedade de amostras e em todas as formas clínicas da doença (Andersen, 1997, Minodier *et al.*, 1997, Campino *et al.*, 2000, Schalling & Oskam, 2002).

2.5.1 – Técnicas de deteção de *Leishmania* sp. em flebótomos fêmeas capturadas na Estação flebotomínica de Alcântara, Lisboa, 2015

2.5.1.1 – Extração de ADN

Após a identificação morfológica das fêmeas flebotomínicas capturadas na Estação flebotomínica de Alcântara, Lisboa, procedeu-se à extração de ADN genómico das fêmeas, menos os últimos três segmentos abdominais. Para isso, utilizou-se o Kit comercial Citogene® para células e tecidos (Citomed, Portugal) seguindo as instruções do fabricante (Figura 20). Realizou-se a maceração dos flebótomos fêmeas com um macerador natural (Sigma, EU) e o volume final de eluição do ADN foi de 30µl.



Figura 20 – Material utilizado para a extração de ADN a partir de flebótomos fêmeas (fotografia de S. Gouveia, 2015).

2.5.1.2 – Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Utilizou-se a PCR para a detecção de *Leishmania* nas fêmeas flebotomínicas capturadas na área de estudo. Para as espécies *P. perniciosus* e *P. ariasi* utilizaram-se como alvos os minicírculos do cinetoplasto de *L. infantum*. Este método é capaz de detetar um único parasita em amostras de cultura *L. infantum* (Cortes et al., 2004). Para as restantes espécies flebotomínicas, *P. sergenti* e *P. papatasi*, utilizaram-se como alvo o espaço intergénico LITSR e L5.8S (Schönian et al., 2003; 2011).

2.5.1.3 – Amplificação de ADN do cinetoplasto

Primers: Os *primers* MC (MC1 e MC2) foram desenhados para amplificar uma sequência do ADNk de *L. infantum*. Teoricamente amplifica uma sequência com 447 pb (Cortes et al., 2004), das quais 42 pb pertencem à região conservada do minicírculo e os restantes (405 pb) à região variável. A sequência MC1 encontra-se na região variável, enquanto a região MC2 encontra-se na região conservada. As sequências são as seguintes:

MC1	5' GTTAGCCGATGGTGGTCTTG 3'
MC2	5' CACCCATTTTTCCGATTTTG 3'

Protocolo de amplificação: As misturas de reação preparam-se em grupo de quatro amostras de ADN para um volume final de 25 μ l: 12,5 μ l MZYTap 2x Green Master Mix (Nzytech, Portugal), 1 μ l de cada primer (5 pmol) (MC1 e MC2), 0,5 μ l de água ultra pura e 10 μ l de ADN (2,5 μ l de ADN de cada amostra).

A PCR efetuou-se num termociclador BIORAD (T100™ Thermal Cycler) (Figura 21) segundo o protocolo de amplificação descrito: um ciclo de desnaturação inicial (94°C, 2 min), seguido de 30 ciclos de desnaturação (94°C, 20 seg.), hibridação (60°C, 20 seg.), extensão (72°C, 30 seg.), com um ciclo de extensão final de 72°C durante 5 minutos (min.).



Figura 21 – Termociclador BIORAD (T100™ Thermal Cycler) utilizado na PCR, com as amostras no seu interior (Fotografia de S. Gouveia, 2015).

2.5.1.4 – Amplificação de ADN ribossomal

Os *primers* ITS1 (LITSR e L5.8S) amplificam parcialmente a sequência do espaço intergénico que separa a subunidade pequena do ADNr e o gene ARNr 5.8S (Schönian et al., 2003; 2011). O tamanho da sequência amplificado varia entre os 300 a 350 pb.

As sequências dos *primers* são as seguintes:

LITSR	5' - CTGGATCATTTTCCGATG - 3'
L5.8S	5' - TGATACCACTTATCGCACTT - 3'

Protocolo de amplificação: A mistura de reação preparou-se seguindo o procedimento anteriormente descrito para o *primer* MC. A PCR efetuou-se num termociclador BIORAD (T100™ Thermal Cycler) seguindo o seguinte protocolo de amplificação: desnaturação inicial (95°C, 2 min.), seguido de 32 ciclos de desnaturação (95°C, 20 seg.), hibridação (53°C, 30 seg.), extensão (72°C, 1 min.), com um ciclo de extensão final de 72°C durante 6 minutos.

Em todas as amplificações utilizou-se como controlo positivo ADN genómico de *L. infantum* e como controlo negativo água ultra pura em substituição do ADN.

Verificação da amplificação: Os produtos da amplificação resultantes dos diversos protocolos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5% em tampão 1x TAE (0,04 M Tris-HCL pH 8, EDTA 0,002 M, acetato de sódio 0,02 M) com 3 µl de Greensafe preminum® (Nzytech, Portugal). Utilizou-se um marcador (8 µl) de 100 pb (Nzytech, Portugal). Aplicou-se uma corrente elétrica de 120V durante 60 minutos.

A visualização dos produtos amplificados em gel efetuou-se num sistema de iluminação ultravioleta (Pharmacia LKB-MacroVue), e posteriormente, fotografaram-se com uma câmara digital (FUJIFILM Corporation, China).

As técnicas e protocolos foram realizados em conjunto com as Colegas Rosa Miguel (XIII MPM, IHMT, UNL) e Hilda Alvarez (IPK, Cuba).

2.5.2 – Técnicas de identificação das fontes de alimentação sanguínea em flebótomos fêmeas capturadas na Estação flebotómica de Alcântara, Lisboa, 2015

2.5.2.1 – Reação em Cadeira da Polimerase (PCR)

Através da técnica da PCR é possível determinar ADN de hospedeiros vertebrados no sangue ingerido pelas fêmeas flebotómicas, até aproximadamente 96 h depois da ingestão sanguínea. Após essas horas, o ADN pode degradar-se por ação das enzimas digestivas do inseto vetor (Abbasi et al., 2009).

2.5.2.2 – Amplificação de um fragmento do gene *citocromo b*

Primers: Para a identificação das refeições sanguíneas, foram utilizados os primers *cyt b1-F* e *cyt b2-R* para amplificar um segmento do gene do citocromo B (*cyt b*) do ADN mitocondrial do hospedeiro com 350 pb (Svobodová et al., 2009).

As sequências dos *primers* são as seguintes:

<i>cyt b1-F</i>	5'- CCATCCAACATYTCADCATGATGAAA-3'
<i>cyt b2-R</i>	5'- GCHCCTCAGAATGATATTTGKCCTCA-3'

Protocolo de amplificação: Para cada amostra (5 µl) foram preparados 20 µl da mistura de reação constituída por 12,5 µl de NZYTaQ 2x Green Master Mix (Nzytech, Portugal), 0,5 µl de cada sequência iniciadora (5 pmol) e 6,5 µl de água ultra pura. Todas as amplificações utilizaram-se como controlo negativo água ultra pura em substituição do ADN.

A PCR efetuou-se num termociclador BIORAD (T100™ Thermal Cycler) segundo o protocolo de amplificação descrito a seguir: um ciclo de desnaturação inicial (94°C, 5 min), seguido de 40 ciclos de amplificação (94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min, 72°C durante 1 min), e uma elongação de 72°C durante 7 minutos.

2.5.2.3 – Verificação da amplificação

A amplificação verificou-se como o que se descreveu no ponto 2.5.1.4, quarto parágrafo.

2.5.2.4 – Sequenciação e análise dos segmentos de ADN

Os produtos amplificados foram submetidos a um processo de purificação, e a sequenciação, pelo serviço StabVida (Portugal), utilizando os mesmos *primers* utilizados na amplificação (*cyt b1* e *cyt b2*) para análise das fontes de alimentação sanguínea.

A identificação de semelhanças entre as sequências nucleotídicas obtidas e as sequências depositadas em bases de dados foi efetuada com recurso ao servidor *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*), foi realizada no laboratório de Leishmanias do IHMT utilizando os algoritmos *BLASTn* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Um nível de homologia maior ou igual a 99% foi aceite como indicativo de um elevado grau de confiança.

2.6 – Análise Estatística

A análise estatística foi realizada recorrendo ao programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Statistics, versão 23.0.

Em relação às espécies *P. perniciosus* e *P. ariasi*, capturadas de maio a novembro de 2015, para verificar se a densidade entre as duas foi diferente e estatisticamente significativa, utilizou-se o teste, não paramétrico, de Wilcoxon, uma vez que cada par (*P. perniciosus* e *P. ariasi*) foi capturado, eventualmente, na mesma armadilha. Assim, as amostras não são totalmente independentes e por isso aplicou-se o teste para amostras emparelhadas.

No que diz respeito ao número total de machos e fêmeas, capturados no mesmo período de tempo, para verificar se a abundância entre os mesmos foi estatisticamente diferente, utilizou-se o teste de Wilcoxon, pelas razões acima referidas.

Para se verificar se houve diferenças estatisticamente significativas entre a densidade flebotomínica das diferentes espécies, nos diferentes meses de captura, utilizou-se o teste de Kruskal Wallis, uma vez que as amostras são independentes, ou seja, as capturas foram realizadas em meses diferentes e, como tal, as amostras não são emparelhadas.

3 – RESULTADOS

3.1 – Espécies flebotomínicas, de ambos os sexos, identificadas morfológicamente e capturadas na Freguesia de Alcântara, Lisboa, 2015

Na Estação flebotomínica de Alcântara, capturaram-se, de maio a novembro de 2015, por armadilhas CDC, no total, 459 flebótomos de ambos os sexos, pertencentes a dois Géneros. Das cinco espécies flebotomínicas assinaladas em Portugal, quatro estão presentes na Estação estudada, tendo-se capturado 365 machos e 94 fêmeas (Quadro 2).

Quadro 2 – Número e espécies de flebótomos capturados, em Alcântara, de maio a novembro de 2015.

Espécies flebotomínicas	Machos	Fêmeas	Total
<i>Phlebotomus perniciosus</i>	188	51	239
<i>Phlebotomus ariasi</i>	123	28	151
<i>Phlebotomus sergenti</i>	53	14	67
<i>Sergentomyia minuta</i>	1	1	2
Total	365	94	459

As espermatecas das diferentes espécies, nomeadamente *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. sergenti* e *S. minuta*, foram fotografadas e os respetivos esquemas estão representados, igualmente, nas figuras 22, 23, 24 e 25.



Figura 22 – Espermateca de *Phlebotomus perniciosus* identificada por microscopia ótica (fotografia de S. Gouveia, 2015 e esquema adaptado de Branco, 2011).



Figura 23 – Espermateca de *Phlebotomus ariasi* identificada por microscopia ótica (fotografia de S. Gouveia, 2015 e esquema adaptado de Branco, 2011).

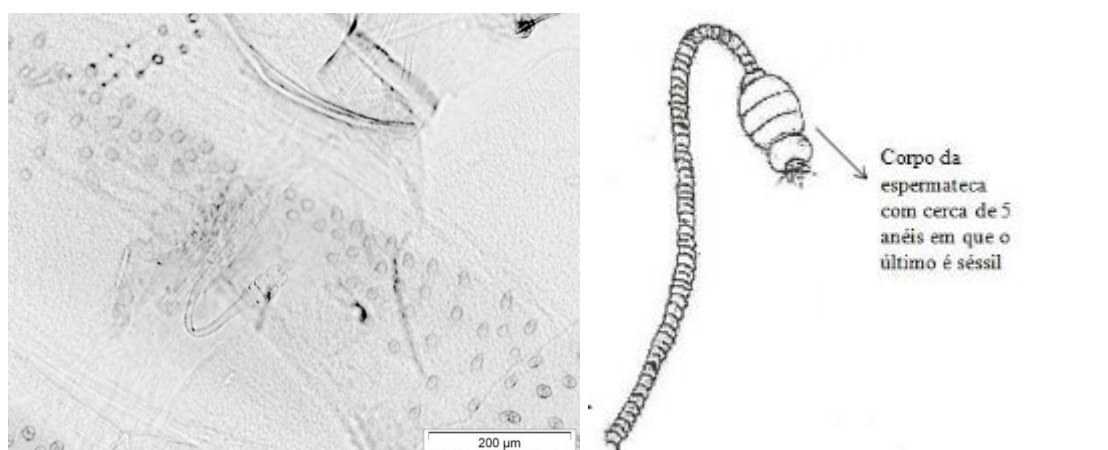


Figura 24 – Espermateca de *Phlebotomus sergenti* identificada por microscopia ótica (fotografia de S. Gouveia, 2015 e esquema adaptado de Branco, 2011).

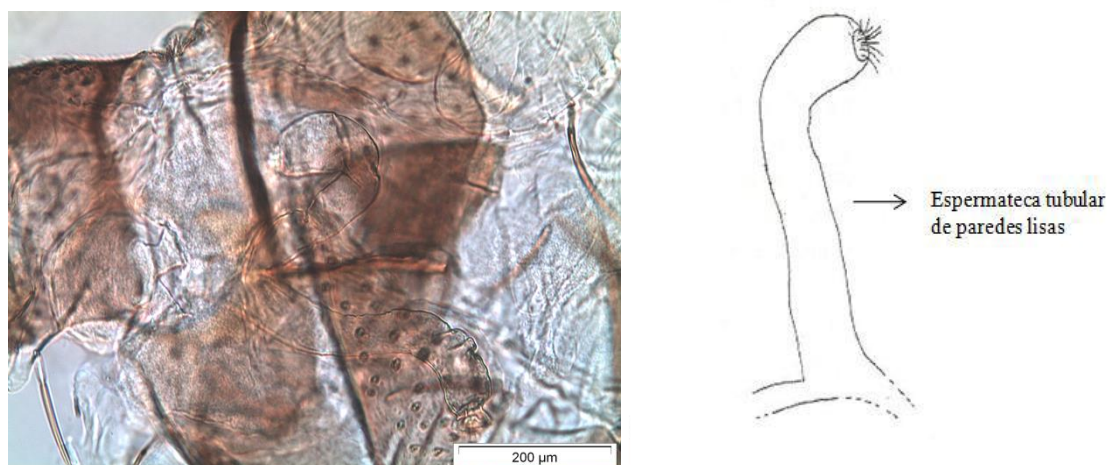


Figura 25 – Espermateca de *Sergentomyia minuta* identificada por microscopia ótica (fotografia de S. Gouveia, 2015 e esquema adaptado de Branco, 2011).

3.1.1 – Abundância relativa

No que diz respeito às abundâncias relativas das espécies capturadas, *P. perniciosus* foi a espécie mais abundante 52,1% (239/459), seguindo-se *P. ariasi* com 32,9% (151/459), *P. sergenti* com 14,6% (67/459) e, por último, *S. minuta* 0,4% (2/459). Não foram capturados quaisquer exemplares de *P. papatasi* (Figura 26).

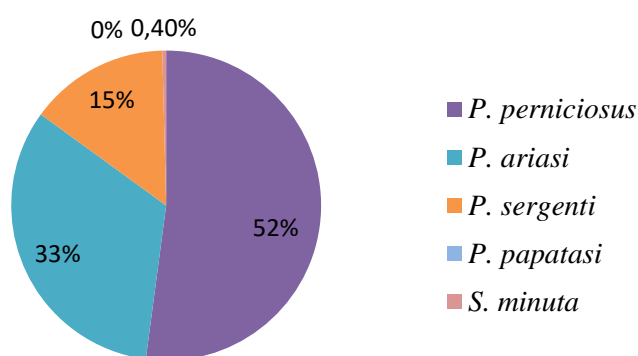


Figura 26 – Abundância relativa (%) das espécies flebotomínicas capturadas em Alcântara, Lisboa, maio a novembro, 2015.

3.1.2 – Razão dos sexos

No total, capturaram-se 365 machos e 94 fêmeas, sendo a razão dos mesmos 3,88:1, o que corresponde a cerca de 4 machos para uma fêmea. Em relação à espécie *P. perniciosus* a razão foi de 3,54:1, *P. ariasi* 4,39:1, *P. sergenti* 3,78:1 e *S. minuta* 1:1 (Quadro 3).

Quadro 3 – Nº de flebótomos, de ambos os sexos, por espécie, capturados em Alcântara, Lisboa, e a razão machos / fêmeas, maio a novembro, 2015.

Espécies	Lisboa, Freguesia de Alcântara (área urbana)		
	Machos	Fêmeas	Razão dos sexos
<i>P. perniciosus</i>	188	51	3,54:1
<i>P. ariasi</i>	123	28	4,39:1
<i>P. sergenti</i>	53	14	3,78:1
<i>P. papatasi</i>	0	0	0
<i>S. minuta</i>	1	1	1:1

3.1.3 – Fêmeas flebotomínicas ingurgitadas e grávidas, capturadas por armadilha CDC, Alcântara, Lisboa, 2015

Das 94 fêmeas capturadas, 20,5% encontravam-se ingurgitadas (sangue, total ou parcial, no abdómen) e 32,9% estavam grávidas (ovos no abdómen). *P. perniciosus* e *P. ariasi* foram as únicas espécies que apresentaram fêmeas ingurgitadas. As fêmeas *P. perniciosus* e *P. sergenti* foram as espécies que apresentaram maior número de grávidas (Quadro 4).

Quadro 4 - Número de fêmeas ingurgitadas e grávidas, das espécies flebotomínicas capturadas em Alcântara, Lisboa, maio a novembro, 2015.

Espécies flebotomínica	Fêmeas ingurgitadas e grávidas		
	Ingurgitadas	Grávidas	Fêmeas capturadas
<i>P. perniciosus</i>	14	16	51
<i>P. ariasi</i>	10	5	28
<i>P. sergenti</i>	0	10	14
<i>S. minuta</i>	0	0	1
Total	24	31	94

3.1.4 – Flebotomíneos machos com a genitália externa, total ou parcialmente rodada, por espécie

Dos 365 machos capturados, 7,9% (29/365) pertencentes às espécies *P. perniciosus*, *P. ariasi* e *P. sergenti* apresentaram as genitália externas, parcialmente ou não rodadas (Figura 27).

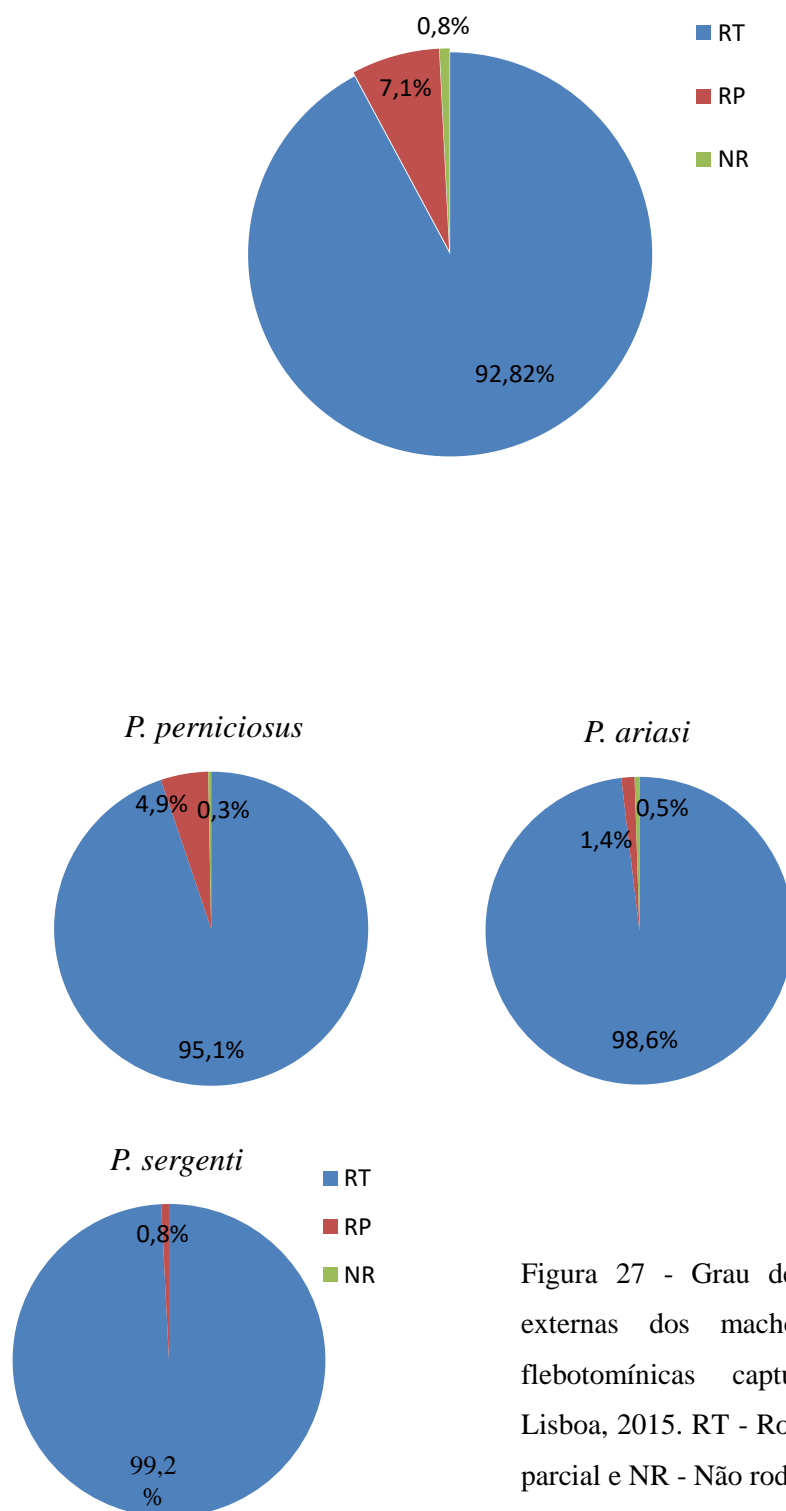


Figura 27 - Grau de rotação das genitálias externas dos machos (%), das espécies flebotomínicas capturadas em Alcântara, Lisboa, 2015. RT - Rotação total, RP - Rotação parcial e NR - Não rodada.

3.1.5 – Flebotomíneos capturados, de ambos os sexos, com ectoparasitas e endoparasitas não *Leishmania*

Do total de 459 flebotomíneos capturados na Estação flebotomínica de Alcântara, Lisboa, um *P. perniciosus* macho, observado ao estereomicroscópio, apresentou no abdômen, face ventral, três ácaros (Figura 28), correspondendo a uma taxa total de infestação por ácaros de 0,22% (1/459). A taxa de infestação de *P. perniciosus* machos por ácaros foi de 0,53% (1/188). O flebótomo infestado foi encontrado num biótopo doméstico, nomeadamente no local da churrasqueira.



Figura 28 – *P. perniciosus* macho infestado com três ácaros observados ao estereomicroscópio, e assinalados com três setas azuis (fotografia de A. Pereira & S. Gouveia, 2015).

Identificou-se um exemplar de *P. perniciosus* fêmea infetada com um nemátode (endoparasita), que foi capturada num biótopo doméstico, nomeadamente na casa das máquinas (piscina)/tubos/interior, traduzindo-se numa taxa de infeção para esta espécie de 1,9% (1/51) e uma taxa de infeção para o total de flebótomos fêmeas de 1,06 % (1/94), (Figura 29).



Figura 29 – *P. perniciosus* fêmea infetada com um nemátode, que se detetou nos 3 últimos segmentos abdominais, junto à espermateca, por observação ao microscópio ótico (fotografia de S. Gouveia, 2015).

3.1.6 – Flebotomíneos capturados, por espécie, e por tipo e variedade de biótopos prospectados

- Na Estação flebotomínica de Alcântara, Lisboa, prospectaram-se quatro tipos de biótopos distintos, nomeadamente três domésticos e um peridoméstico.
- Relativamente à variedade de biótopos (Figura 30), os domésticos representam o local correspondente à churrasqueira, à entrada da casa das máquinas da piscina e à parte interior da casa das máquinas da piscina/tubos. O biótopo peridoméstico refere-se ao aviário.
- Dos vários tipos de biótopos prospectados, constatou-se que as maiores abundâncias flebotomínicas foram observadas nos biótopos domésticos (Quadro 8).
- Capturou-se uma maior quantidade de flebotomíneos no biótopo cave/tubos, nomeadamente 80,5% (294/365) machos e 67% (63/94) fêmeas (Quadro 5).

Quadro 5 – Número de flebótomos capturados, por espécie, sexo, e por tipo de biótopos prospetados, em Alcântara, Lisboa, maio a novembro, 2015.

PN – *P. perniciosus*; PA – *P. ariasi*; PS – *P. sergenti*; SM – *Sergentomyia minuta*; BDM- biótopo doméstico e BPDM- Biótopo peridoméstico.

Biótopos		PN				PA				PS				SM				Total			
Tipos	Variedades	♂		♀		♂		♀		♂		♀		♂		♀		♂		♀	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
BDM	Churrasqueira	19	63,3	4	50	6	20	1	12,5	4	13,3	3	37,5	1	3,3	0	0	30	8,2	8	8,5
	Entrada/Tubos	21	53,8	16	76,2	10	25,6	4	19	8	20,5	1	4,8	0	0	0	0	39	10,7	21	22,3
	Cave/tubos	147	50	29	46	106	36,1	23	36,5	41	13,9	10	15,9	0	0	1	1,5	294	80,5	63	67
BPDM	Casa das aves	1	50	2	100	1	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,5	2	2,1

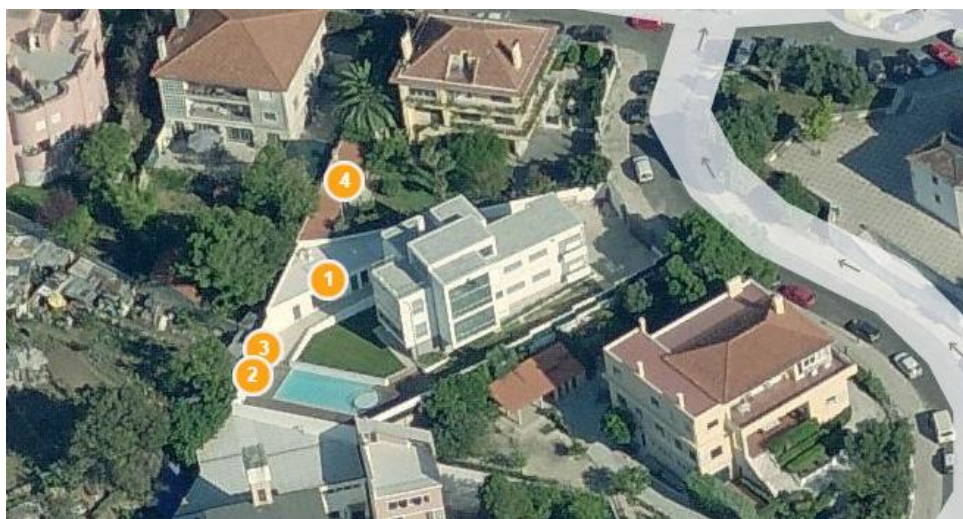


Figura 30 – Estação flebotomínica de Alcântara, Lisboa, 2015, assinalados os diferentes tipos de biótopos. Casa 1: 1- Churrasqueira, 2 – Entrada/tubos, 3 – Cave/tubos e Casa 2: 4 – Aviário. Retângulo azul: piscina da Casa 1 (adaptado de <https://www.arcgis.com/home/webmap/viewer.html?webmap=7ec08e5438304dbfa1e26181503e6fa8>; acedido a 25 de abril de 2016).

3.1.7 – Densidades flebotomínicas, por espécie e por meses de captura, e variação sazonal

A densidade flebotomínica total foi mais elevada nos meses de junho (2,9) e setembro (3,13). Em relação às diferentes espécies capturadas, a densidade de *P. perniciosus* foi mais elevada em junho (1,83) e agosto (1,56), *P. ariasi* em setembro (1,63) e outubro (1), e *P. sergenti* em julho (0,48) e agosto (0,42). Assim, as densidades mais elevadas corresponderam às espécies *P. perniciosus* e *P. ariasi*.

As temperaturas médias, máxima e mínima, foram mais elevadas nos meses de maio (29°C) e agosto (26,5°C), e em novembro verificou-se que a humidade relativa foi mais elevada que nos restantes meses devido à pluviosidade registada.

Em relação à variação sazonal, verificou-se uma tendência bifásica, em que as densidades flebotomínicas totais foram mais elevadas e com um pico em junho, diminuindo em julho e aumentando em agosto e setembro (segundo pico), diminuindo novamente em outubro e deixando de se observar quaisquer flebotomos capturados a partir de novembro (Figura 31).

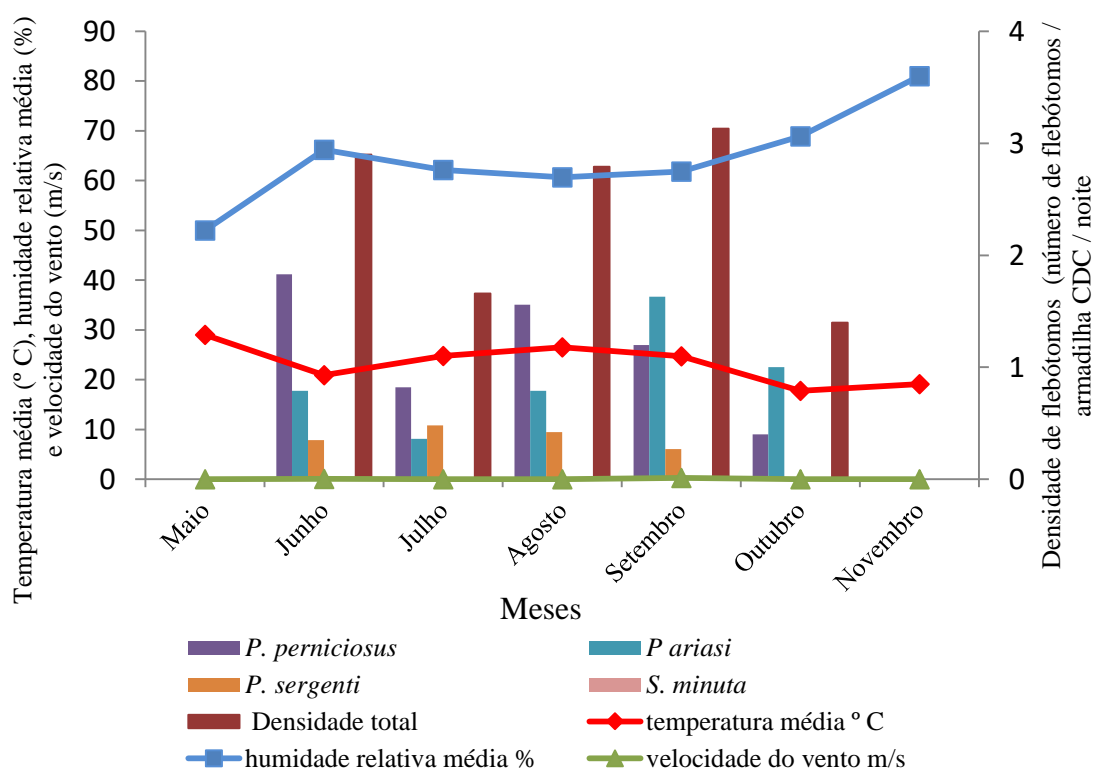


Figura 31 – Densidades, por espécie e total, dos flebotomíneos capturados de maio a novembro, 2015, na Estação flebotomínica de Alcântara, Lisboa.

3.2 – Influência das fases lunares nas densidades flebotomínicas, maio a novembro, 2015

Em relação aos flebotomíneos capturados na Estação flebotomínica de Alcântara, Lisboa, de junho a outubro, verificou-se sempre uma maior densidade flebotomínica total na Fase de Lua Nova (LN). O mês de agosto foi o que apresentou uma maior diferença no que diz respeito à densidade dos flebótomos capturados na Fase de Lua Nova: 3,5 e na Fase de Lua Cheia (LC): 1,67 (Figura 32).

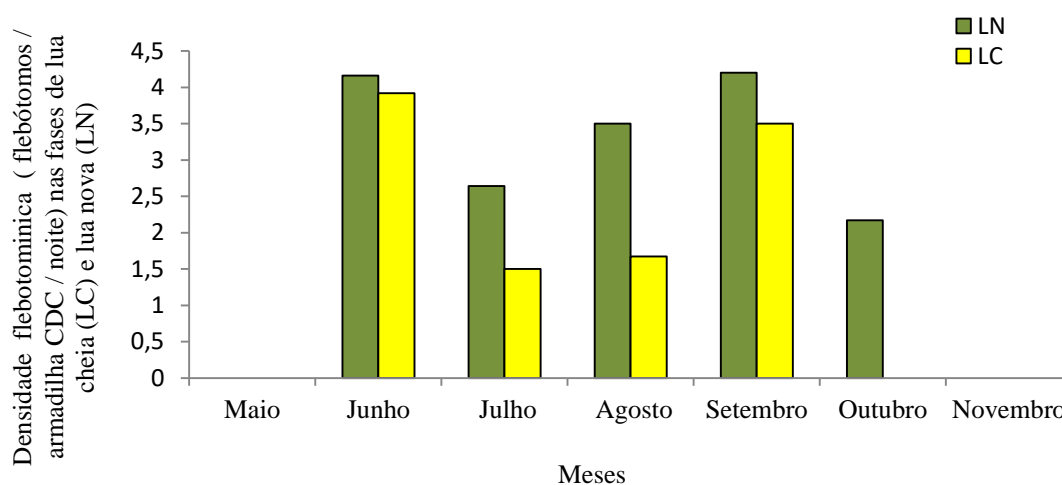


Figura 32 – Densidades flebotomínicas totais durante as fases de Lua Cheia (LC) e Lua Nova (LN), de maio a novembro 2015, Alcântara, Lisboa.

3.3 – Detecção molecular de *Leishmania* sp. nas fêmeas capturadas, Alcântara, Lisboa

Da análise das 94 amostras de ADN de flebótomos fêmeas capturadas na estação flebotomínica de Alcântara, Lisboa, não se obteve amplificação de ADN de *Leishmania* com nenhum dos pares de *primers*. Na Figura 33 apresentam-se os resultados negativos de amostras estudadas para cada par de sequência iniciadora (*primer*) utilizada.

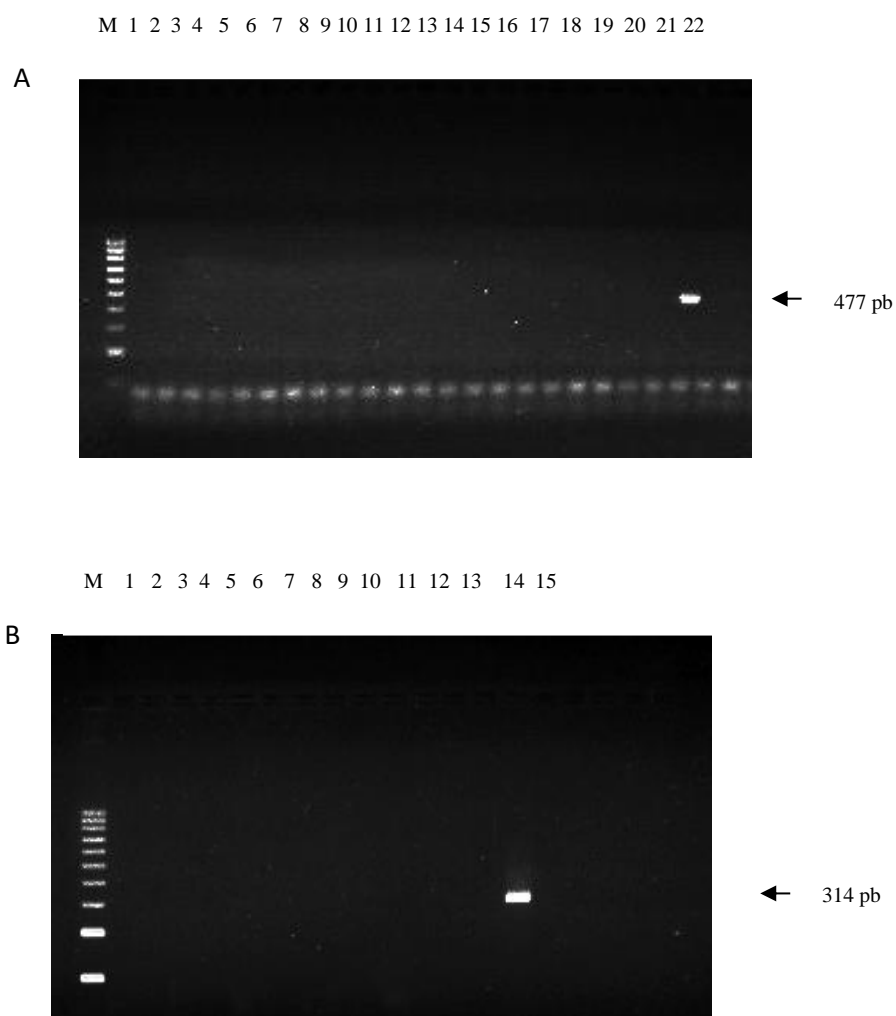


Figura 33 – Eletroforeses em gel de agarose de produtos de amplificação por PCR com os *Primers* MC1/ MC2 e LITSR / L5.8S. (A) MC1/ MC2 - Linha 1-20: produtos de PCR, Linha 21: controlo negativo (sem ADN), Linha 22: controlo positivo (amostra de ADN de *Leishmania* sp.) (B) LITSR/L5.8S - Linha 1-13: produtos de PCR, Linha 14: controlo positivo (amostra de ADN de *Leishmania* sp.), Linha 15: controlo negativo. M: Marcador de massa molecular de 100 pb (fotografia de S. Gouveia, 2015).

3.4 – Identificação molecular das refeições sanguíneas, das fêmeas flebotomínicas ingurgitadas, em diferentes hospedeiros vertebrados, Alcântara, Lisboa

Das 94 fêmeas capturadas, 24 encontravam-se ingurgitadas (presença de sangue no abdómen), pertencentes às espécies *P. perniciosus* e *P. ariasi*, 14 e 10 fêmeas, respetivamente. Duas fêmeas de *P. perniciosus* com sangue muito digerido não foram analisadas.

Obteve-se produto de amplificação do segmento de 350 pb do gene *cyt b* de vertebrados em 22 fêmeas ingurgitadas analisadas (*P. perniciosus* - 12 e *P. ariasi* - 10), (Figura 34).

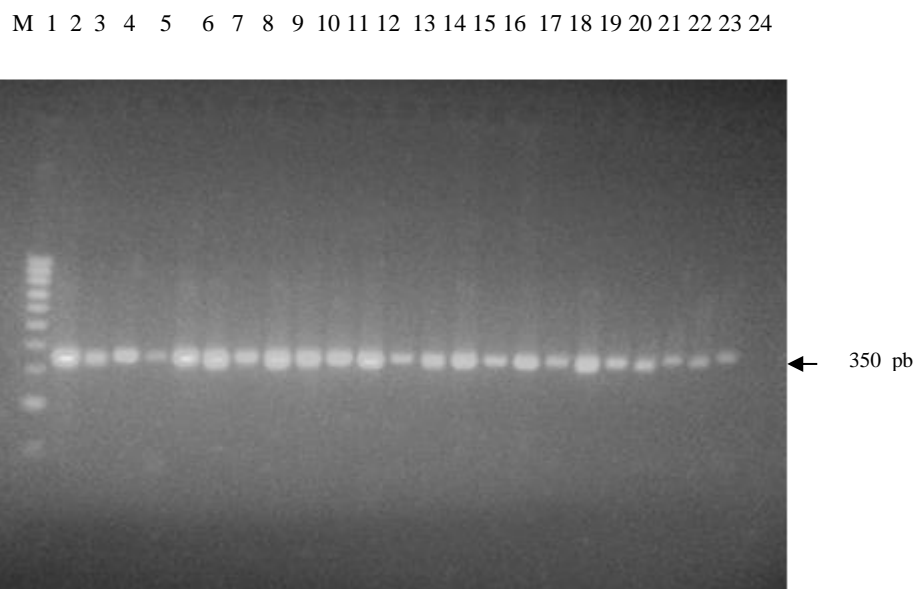
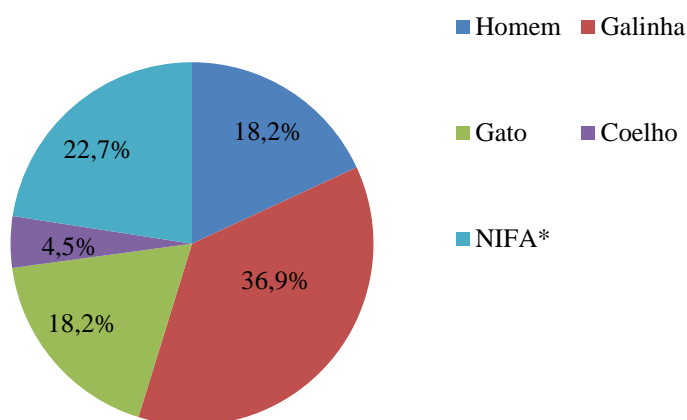


Figura 34 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR com as sequências iniciadoras do segmento do gene *cyt b* de vertebrados. Linha 1-23: amostras de ADN de fêmeas de flebótomos ingurgitadas, Linha 24: controlo negativo, M: marcador molecular de 100 pb (fotografia de S. Gouveia, 2015).

A identificação da fonte de alimentação, por análise comparativa das sequências do Genbank com as sequências nucleótídicas do segmento do gene *cyt b* amplificadas, foram realizadas em 17 fêmeas. Foram detetadas, no total, 4 fêmeas alimentadas em seres humanos (*Homo sapiens*), 8 em galinha (*Gallus gallus*), 4 em gato e 1 em coelho (*Oryctolagus cuniculus*). Para 2 das fêmeas (9,1%) não foi encontrada homologia de sequências e em 3 não se obteve a sequência (Figura 35).



*NIFA: não identificada fonte de alimentação (não foi possível determinar as sequências nucleotídicas ou não foi encontrada homologia com as sequências de Genbank).

Figura 35 – Proporção (%) das diferentes fontes de alimentação de fêmeas ingurgitadas capturadas em Alcântara, Lisboa, maio a novembro, 2015.

No que diz respeito à espécie *P. perniciosus* detetaram-se 2 fêmeas alimentadas em humano (16,7%), 4 fêmeas em galinhas (33,3%) e 1 fêmea em gato (8,3%). Para 2 das fêmeas (16,7%) não foi encontrada homologia entre as sequências e em 3 (25%) não se obteve a sequência, quer dizer que em 41,% das fêmeas da referida espécie, não foi possível identificar a fonte de alimentação sanguínea.

Em *P. ariasi* foram detetadas 2 fêmeas alimentadas em humano (20%), 4 em galinha (40%), 3 fêmeas em gato (30%) e 1 fêmea em coelho (10%) (Quadro 6).

Em todas as comparações de sequências obteve-se entre 99 e 100% de homologia.

Quadro 6 – Identificação da fonte de alimentação sanguínea de flebotomos fêmeas capturadas em Alcântara, Lisboa, maio a novembro, 2015, por análises das sequências obtidas após a amplificação de um segmento do gene *cyt b*.

Espécies de flebotomíneos	Hospedeiros vertebrados				
	Homem	Galinha	Gato	Coelho	NIFA*
<i>P. perniciosus</i>	2	4	1	0	5
<i>P. ariasi</i>	2	4	3	1	0
Total	4	8	4	1	5

*NIFA: não identificada a fonte de alimentação (não foi possível determinar as sequências nucleotídicas ou não foi encontrada homologia com as sequências de Genbank).

3.5 – Análise estatística dos resultados obtidos

Entre o número total de *P. perniciosus* e *P. ariasi* capturados, de maio a novembro de 2015, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$ (0,001), tendo sido o número de *P. perniciosus* superior à espécie *P. ariasi* (Quadro 7).

Quadro 7 – Nível de significância para *P. perniciosus*/*P. ariasi*.

Hypothesis Test Summary				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between <i>P. perniciosus</i> and <i>P. ariasi</i> equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,001	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

No que diz respeito ao número total de flebotomíneos capturados por armadilhas CDC, em igual período, o número de machos foi superior ao número de fêmeas, $p \leq 0,05$ (0,000) (Quadro 8).

Quadro 8 – Nível de significância para o número total de flebotomíneos machos e fêmeas.

Hypothesis Test Summary				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The median of differences between machos and femeas equals 0.	Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Em relação às densidades das diferentes espécies flebotomínicas, por mês de captura, as diferenças não foram estatisticamente significativas, $p > 0,05$ (Quadro 9).

Quadro 9 – Nível de significância para as densidades flebotomínicas, por espécie, e por mês de captura.

Hypothesis Test Summary				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of <i>P. perniciosus</i> is the same across categories of mes.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,102	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of <i>P. ariasi</i> is the same across categories of mes.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,352	Retain the null hypothesis.
3	The distribution of <i>P. sergenti</i> is the same across categories of mes.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,597	Retain the null hypothesis.
4	The distribution of <i>S. minuta</i> is the same across categories of mes.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,805	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

4 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Em Portugal, *Leishmania infantum* é o agente causal da leishmaniose humana, visceral e cutânea, e canina, sendo os insetos comprovadamente vetores as espécies flebotomínicas *P. perniciosus* e *P. ariasi*.

No passado, a referida parasitose esteve intrinsecamente associada às condições de pobreza, à precaridade das condições socioeconómicas, à ausência de serviços nacionais de saúde, e ocorria predominantemente em zonas rurais ou periurbanas de forma sazonal. Contudo, esta tendência tem vindo a alterar-se, verificando-se, cada vez mais, em zonas urbanas/suburbanas, aparecendo focos importantes na periferia das cidades e de outros aglomerados urbanos, e também em classes sociais com maior poder económico. No entanto, já o iminente Professor Doutor Fraga de Azevedo (1946), preconizava estas alterações, ao dizer “*aparecendo nas classes mais elevadas e a propósito convém referir a ocorrência de um caso no filho de um colega da capital*”.

O estudo efetuado na Estação flebotomínica de Alcântara, em 2015, teve como principal objetivo, caracterizar e atualizar a fauna flebotomínica de uma área urbana da capital do País, que não era estudada desde há cerca de 70 anos, quando o Professor Fraga de Azevedo e seus colaboradores (1946) capturaram flebótomos, em Lisboa, nomeadamente na Junqueira, Ajuda, Poço do Bispo, Campo Grande, Areeiro, Benfica e Sete Rios. Nestas áreas, e tal como foi verificado no estudo realizado em 2015, capturaram as espécies *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. sergenti* e *S. minuta*, que na época ainda chamavam *P. minutus*. No entanto, na zona mais próxima da Estação flebotomínica de Alcântara, que foi a Junqueira, apenas capturaram duas espécies: *P. perniciosus* e *P. ariasi*, tendo sido *P. perniciosus* a espécie com maior abundância relativa - 95,1% (77/81). Assim, e em relação ao presente estudo, *P. perniciosus* foi também a espécie mais abundante 52,1% (239/459), seguida igualmente de *P. ariasi* com 32,9% (151/459), porém foram capturadas outras espécies: *P. sergenti* com 14,6% (67/459) e *S. minuta* com 0,4% (2/459).

Comparativamente a outros estudos realizados em Portugal, com o mesmo método de captura (armadilha CDC), nomeadamente em Trás-os-Montes e Alto Douro (Alves-Pires et al., 1991; Afonso et al., 2007), Arrábida (Afonso et al., 2005), Coimbra (Pereira et al., 2009), Torres Novas (Branco et al., 2013), Évora (Alves-Pires et al.,

2004) e Algarve (Alves-Pires et al., 2008; Maia et al., 2019; Mendonça, 2011; Maia et al., 2013), *P. perniciosus* foi igualmente a espécie com maior abundância relativa/densidade, com exceção de Trás-os-Montes e Alto Douro em que *P. ariasi* apresentou maior abundância (73,1 %) em relação às outras espécies capturadas (Afonso et al., 2007). Neste caso, no norte do País, é natural que seja *P. ariasi* a espécie mais abundante, em relação à espécie *P. perniciosus*, pois como foi referido anteriormente, aquela espécie tem preferência por regiões quentes mas mais húmidas.

Comparando os resultados obtidos na cidade de Lisboa, Portugal, no que diz respeito às espécies flebotomínicas capturadas, com outras cidades de Países Europeus endémicos para leishmaniose humana e canina, verifica-se que em relação a Espanha, em Fuenlabrada-Madrid, Jiménez e colaboradores (2013) capturaram 174 flebótomos, por armadilha CDC, dos quais 171 exemplares pertenciam à espécie *P. perniciosus* e 3 a *S. minuta*. Neste caso, é interessante observar que também na Estação flebotomínica de Alcântara *P. perniciosus* foi a espécie mais abundante e, praticamente, não foram capturados exemplares de *S. minuta* (apenas um macho e uma fêmea), tal como foi referido nos resultados apresentados. No entanto, num trabalho conjunto, realizado por Gouveia et al., 2016, no mesmo ano de captura (2015), numa área rural de Palmela, a espécie mais abundante foi *S. minuta* 64,7% (44/68), ainda que as capturas tenham sido efetuadas por armadilha CDC.

Segundo Prudhomme e colaboradores (2015), o risco de reemergência da leishmaniose tem aumentado em França. Contudo, de acordo com os mesmos, o estudo bioecológico dos vetores, no sul de França, não tem sido suficientemente estudado. Assim, os referidos investigadores efetuaram um estudo entomológico, de maio a outubro, de 2011 a 2013, entre as cidades de Saint-Julien de la Nef e Vigan, cujos critérios de escolha dos locais de captura flebotomínica foram os seguintes: terem sido anteriormente estudados pelo Professor Rioux e apresentarem condições favoráveis à presença de flebotomíneos (casas, muros, animais e outros). As espécies capturadas, por ordem decrescente, foram: *P. ariasi*, *S. minuta*, *P. perniciosus* e *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascitti* tendo sido a primeira a mais abundante e, contrariamente ao que se verificou em Lisboa, os picos de maior densidade total foram nos meses de julho e agosto, enquanto que os do presente estudo (Lisboa) foram em junho e setembro. Assim, ainda que em anos próximos, os riscos de maior transmissão de

Leishmania, tivessem sido desfasados de um mês, em cada um dos picos de eclosão, ambos apresentaram uma tendência bifásica.

Em Itália, estudos pioneiros em “Kala-Azar Mediterrânico” foram efetuados por Adler e Theodor em 1930, e identificaram a cidade de Catania, na Sicília, como o foco major da doença. Presentemente, mantém-se como um foco de LV zoonótico, sabendo-se que quer no Homem, quer nos cães a doença é altamente prevalente mas, também neste foco urbano, o estudo dos flebótomos vetores não tem sido realizado. Lisi e colaboradores (2014), efetuaram, nesta cidade, um estudo faunístico, de abril a dezembro de 2006 a 2013, utilizando papéis impregnados, ao longo de estradas públicas, e capturaram 4.341 exemplares, pertencentes a seis espécies. Ainda que utilizando papéis impregnados, as três espécies mais abundantes foram *P. perniciosus*, mesmo no centro da cidade (36,5%), *P. sergenti* (2,5%) e *P. (Larrousius) neglectus* (1,5%). Tal como o estudo efetuado na Estação flebotomínica de Alcântara, em que os estudos mais recentes tinham sido efetuados há 70 anos, e que as condições ambientais de ambas as cidades e áreas urbanas tinham mudado, os flebótomos e em particular *P. perniciosus* parecem ter uma enorme capacidade de adaptação às referidas alterações ambientais.

De facto, pelos exemplos acima demonstrados, e outros realizados em regiões endémicas de leishmaniose, e mesmo em Países Europeus (Alten et al., 2016) o estudo dos flebótomos vetores tem sido negligenciado, e é de salientar que as condições ambientais e climáticas, como já anteriormente referido, vão ainda tornar mais “perigosa” a presença flebotomínica.

É de referir, que tal como demonstrado por outros investigadores (Ferrolho et al., 2015), esta Estação flebotomínica não constituiu apenas uma área de repouso, para ambos os sexos, e de refeições sanguíneas para as fêmeas, mas também uma área provável de postura e eclosão de adultos, uma vez que os machos apresentaram 7,9% (29/365) das genitálias externas parcialmente, ou totalmente não rodadas.

Podemos, então, concluir que o estudo da Estação flebotomínica de Alcântara, permitiu:

- atualizar o conhecimento bioecológico dos flebótomos existentes numa área urbana da cidade de Lisboa e em que as condições ambientais e socioeconómicas são extremamente favoráveis, mas também são favoráveis à

presença de flebotomíneos, cujas espécies são comprovadamente vetoradas de *Leishmania infantum*;

- demonstrar que a presença de *P. perniciosus* e de *P. ariasi*, como espécies mais abundantes, constituem um risco de transmissão vetorial, não só para a área estudada mas também para o bairro, freguesia e, quiçá, a cidade. É de referir, que os proprietários da Estação já tiveram cães e um gato com leishmaniose comprovada laboratorialmente, sem nunca terem saído para outras áreas consideradas endémicas;
- verificar, tal como outros investigadores observaram (Aguiar et al., 1985; Santos-de-Marco et al., 2002; Colacicco-Mayhugh et al., 2011; Gaglio et al., 2014; Gebresilassie et al., 2015), que mesmo numa área urbana de uma cidade, como Lisboa, quando se efetua capturas flebotomínicas, por armadilhas luminosas CDC, no exterior, as fases da Lua, particularmente Lua Cheia/Lua Nova, têm influência nas capturas, refletindo-se na densidade flebotomínica mensal;
- verificar, por técnicas de biologia molecular, que, tal como demonstrado em outras regiões de Portugal (Branco et al., 2013) e em outros países (Jiménez et., 2013) *P. perniciosus* tem uma grande plasticidade trófica, não deixando de se alimentar no Homem, mesmo quando tem diferentes animais na mesma área;
- observar que das 17 fêmeas capturadas ingurgitadas das espécies *P. perniciosus* e *P. ariasi*, nenhuma se alimentou em cães, apesar destes estarem presentes na estação flebotomínica prospetada. Esta ocorrência, provavelmente, deve-se ao facto de os cães usarem coleiras repelentes com inseticidas para flebótomos (Sacalibor®), durante o período de atividade flebotomínica, uma vez que os proprietários tinham tido, anteriormente, outros cães que morreram com leishmaniose e, consequentemente estavam alertados para esta zoonose;
- aconselhar os proprietários da Estação flebotomínica, estudada durante 2015, que na casa das máquinas, de apoio à manutenção da piscina, e que apresentou a maior abundância de flebótomos, de ambos os sexos, e machos com a genitália externa parcial ou não rodada, devem ser retiradas, pelo menos semanalmente, todas as folhas que entram do jardim e outras matérias orgânicas que se encontram na mesma (fonte de postura, desenvolvimento larvar, eclosão de

adultos e abrigo). Nesta mesma área, durante o entardecer e à noite, deverá estar ligado um electrocutor apropriado para captura e eliminação de dípteros. Também, os proprietários, ao utilizarem a piscina durante o entardecer, devem usar repelentes para insetos, várias vezes, durante a permanência nos jardins;

- sugerir que novos estudos vetoriais devem ser realizados, não só nesta Estação (como vigilância) mas em outras áreas urbanas e peri-urbanas da cidade de Lisboa, bem como estudar a prevalência das infeções assintomáticas para leishmaniose nas populações (humanas e animais) residentes.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbasi, I., Cunio, R. & Warburg, A. 2009. Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using Cytochrome *b* PCR Reverse Line Blotting. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 9. 79-86.

Abranches, P. Santos-Gomes, G. M. & Campino, L. 1993. Epidemiology of leishmaniasis in Portugal, *Arch Inst Pasteur Tunis*, 70, 197-204.

Abranches, P., Conceição-Silva, F. M., Silva Pereira, M. C. 1984. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrabida. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 8, 197-200.

Abrantes, P. & Silveira, H. Alterações climáticas na Europa: efeito nas doenças parasitárias humanas. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 27 (2), 71-86.

Adler, S. & Theodor, O. 1926. The identity of *Leishmania tropica* and *Herpetomonas papatasii*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 20, 355.

Adventurezone 2016. *Leishmaniose* [Em linha]. Brasil: Adventurezone. Disponível em: http://www.adventurezone.com.br/img_editor/leishmaniose003.jpg [acedido a 8 agosto 2016].

Afonso, M. O. & Alves-Pires, C. 2008. Capítulo 2. Bioecologia dos vectores. In: *Leishmaniose canina*, Santos, G. e Fonseca, I. P., ISBN nº 978-972-8987-16-9, Chaves Ferreira - Publicações S.A. Lisboa: 27-40.

Afonso, M. O. 2015. Família PSYCHODIDAE (flebotomos). Sistemática, morfologia, distribuição, bioecologia e importância em Medicina. Identificação morfológica de espécies flebotomínicas. Aula Teórica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, XIII Mestrado de Parasitologia Médica: 119pp.

Afonso, M. O., 2012. Bioecologia e importância médica das glossinas (DIPTERA, GLOSSINIDAE) e dos flebotomos (DIPTERA, PSYCHODIDAE) como vectores de tripanossomatídeos. *Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, Edição

Comemorativa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, 11, 85-89.

Afonso, M. O., Brazil, R., Alves-Pires, C. 2007a. Carlos França in the Science (1877-1926). *Acta Parasitológica Portuguesa*, 14 (1-2), 23-26.

Afonso, M. O., Campino, L., Cortes, S. & Alves-Pires, C. 2005. The phlebotomine sandflies of Portugal. XIII- Occurrence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 in the Arrábida leishmaniasis focus. *Parasite*, 12, 69-72.

Afonso, M. O., Cardoso, L., Anastácio, S., Janz, J. G., Semião-Santos, S., Sousa, S., Rodrigues, J., Rodrigues, M. & Alves-Pires, C. 2007b. The phlebotomine sand flies of Portugal- XI. Ecology of the leishmaniosis vectors in Alijó municipality, Alto Douro region, 2001. *Acta Paras Port*, 14, 19-22.

Afonso, M.O., Baptista, S., Campino, L., Casimiro, E., Ready, R.P. & Alves-Pires, C., 2006. Os flebotomos de Portugal – XIV. Distribuição e bioecologia de *Phlebotomus perniciosus* e *Phlebotomus ariasi*, vectores de *Leishmania infantum* em Portugal Continental, XII Congresso Ibérico de Entomologia, 11-14 de Setembro, Alicante, Espanha, *Abstract book*: 158.

Aguiar, G. M. & Medeiros, W. M. 2003. Distribuição regional e habitats das espécies de flebotomíneos do Brasil, In: Rangel, E. F., Lainson, R. (Org.). Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro. *Editora Fiocruz*, 3, 207-55.

Aguiar, G. M., Vilela, M. L., Schuback, P. A., Soucasaux, T. & Azevedo, A. C. R. 1985. Aspectos da ecologia dos flebotomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. IV. Frequência mensal em armadilhas luminosas (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 80 (4), 465-84.

Alcoforado, M.J. 1988. *O clima da região de Lisboa. Vento, Insolação e Temperatura*. Dissertação de Doutoramento, Faculdade de Letras da Universidade de Lisboa.

Alten, B., Maia, C., Afonso, M. O., Campino, L., Jiménez, M., González, E. Molina, R., Bañuls, A. L., Prudhomme, J., Vergnes, B., Toty, C., Cassan, C., Rahola, N., Thierry, M., Sereno, D., Bongiorno, G., Bianchi, R., Antoniou, M., Christodoulou, V., Mazeris,

- A., Karakus, M., Ozbel, Y., Arserim, S. K., Kasap, O. E., Gunay, F., Oguz, G., Kaynas, S., Tsertsvadze, N., Tskhvaradze, L., Giorgobiani, E., Gramiccia, M., Volf, P. & Gradoni, L. 2016. Seasonal Dynamics of Phlebotomine Sand Fly Species Proven Vectors of Mediterranean Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum*. *PLOS Negl Trop Dis*, 10 (2), 1-22.
- Alvar, J., Cañavete, C., Molina, R., Moreno, J. & Nieto, J. 2004. Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 57, 1-88.
- Álvares, D. & Silva, E. P. 1911. Sobre a frequência de kala-azar nos cães de Lisboa. *Med Cont*, 14, 97.
- Álvares, D. 1910. Um caso de kala-azar infantil em Lisboa. *Med Contemp*, 13, 90-7.
- Alves-Pires, C., Afonso, M.O., Janz, J.G. & Semião-Santos, S.J. 2004. The phlebotomine sand flies of Portugal. XII. The phlebotomine of the Évora leishmaniasis focus (1999-2000). *Acta Parasitológica Portuguesa*, 11 (1-2), 41-5.
- Alves-Pires, C., Campino, L., Afonso, M.O., Santos-Gomes G., Dedet, J.-P. & Pratlong, F. 2001. Les phlébotomes du Portugal X- Infestation naturelle de *Phlebotomus perniciosus* par *Leishmania infantum* MON-1 en Algarve. *Parasite*, 8, 374-5.
- Alves-Pires, C., Campino, L., Janz, J.G. & Afonso, M.O. 2008. Os flebotomos de Portugal. XIV – Os vectores de leishmaniose no foco zoonótico do Sotavento Algarvio. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 15 (1-2), 39-52.
- Alves-Pires, C., Santos-Gomes, G.M., Pratlong, F., Ribeiro, H., Campino, L. & Abranches, P. 1991. Phlébotomes du Portugal. IV. Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* par *Leishmania infantum* MON-24 dans le foyer de l'Alto Douro. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 66 (1), 47-8.
- Amóra, S. S. A., Bevilaqua, C. M. L., Dias, E. C., Feijó, F. M. C., Oliveira, P. G. M., Peixoto, G. C. X., Alves, N. D., Oliveira, L. M. B. & Macedo, I., T. F. 2010. Monitoring of *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 in an area of intense transmission of visceral leishmaniasis in Rio Grande do Norte, Northeast Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 19 (1), 41-5.

- Andersen, A. A. 1997. Two new serovars of *Chlamydia psittaci* from North American birds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9, 159-64.
- Andrade, A. R. O., Dorva, M. E. M. C., Andrade, S. M. O., Marques, A., Silva, B. A. K. & Andreotti, R. 2012. Phlebotomine fauna in the Ponta Porã city: epidemiological importance in border line between Brazil and Paraguay. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, 362–66.
- Andrade, C. R., Kido, E. A., Luna, L. K. S., Melo, M. A., Andrade, P. P. & Balbino, V. Q., 2006. *As leishmanias: origem e classificação*. [livro eletrônico] Brasil: Gentrop, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Disponível em: https://www.ufpe.br/biolmol/Leishmanioses-Apostila_on_line/origem_classificacao.htm [acedido 29 julho 2016].
- Antoine, J. C. 1994. Leishmanies cycle et adaptations. *Médecine et Armées*, 22 (1), 23-7.
- Antunes F. 2003. *Manual sobre doenças Infecciosas*. Lisboa, Permanyer Portugal. 428-30.
- ArcGis 2016. *ArcGis – ArcGis Imagery* [Em linha]. Lisboa: Esri. Disponível em: <https://www.arcgis.com/home/webmap/viewer.html?webmap=7ec08e5438304dbfa1e26181503e6fa8> [acedido a 25 abril 2016].
- ARSLVT - Administração Regional de Lisboa e Vale do Tejo 2015. Perfil de Saúde e Seus Determinantes da Região de Lisboa e Vale do Tejo [Em linha], 1, 143. Disponível em: http://www.arslvt.min-saude.pt/uploads/writer_file/document/875/VOL1_-_Perfil_de_Sa_de_-_Determinantes.pdf [acedido a 23 de agosto 2016].
- Azevedo, J. F. 1946. Novos dados sobre a biologia das espécies de *Phlebotomus* de Lisboa e arredores. *Anais do Instituto de Medicina Tropical*, 3, 7-20.
- Baneth, G., Koutinas, A. F., Gallego-Solano, L., Bourdeau, P. & Ferrer, L. 2008. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on a expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, 24, 324-30.

- Baptista, S., Afonso, M. O., Casimiro, E., Campino, L., Ready, R. P. & Alves-Pires, C. 2007. Spatial distribution of *Leishmania* sandfly vectors in Portugal: risk areas, climate changes and impacts on tourism. *International Conference on Climate Change Impacts on Tourism (CLITOP)*, 7-8 September, Lisbon, Portugal. *Abstract book*.
- Barral, A. & Costa, J. 2011. Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas. *Fiocruz*, 8, 235.
- Bastos, T. S. A. 2014. Espécies de Flebotomíneos e Ecoepidemiologia na cidade de Goiás-Go, Brasil. Dissertação de mestrado, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás.
- Bates, P. A. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand fly. *International Journal for Parasitology*, 37, 1097-106.
- Bates, P., Depaquit, J., Galati, E. A. B., Kamhawi, S., Maroli, M., McDowell, M. A., Picado, A., Ready, P. D., Salomón, O. D., Shaw, J. J., Traub-Csekö Y. M. & Warburg, A. 2015. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. *Parasites & Vectors*, 8, 131.
- Bayer HealthCare – Divisão Saúde Animal 2012. Flebotomos [Em linha]. Portugal: Livre de Parasitas. Disponível em: <http://www.livredeparasitas.com/pt/parasitas-externos/tudo-sobre-parasitas-externos/flebotomos/> [acedido a 4 agosto 2016].
- Beauk, Paul 2016. *Phlebotomus perniciosus* (1) [Em linha]. Netherlands: Diptera.info. Disponível em: http://diptera.info/photogallery.php?photo_id=4790 [acedido 17 agosto 2016].
- Boubidi, S.C., Benallal, K. & Boudrissa, A. 2011. *Phlebotomus sergenti* (Parrot, 1917) identified as *Leishmania killicki* host in Ghardaïa, south Algeria. *Microbes and Infection*, 13, 691-6.
- Branco, S. I. 2011. *Estudo dos flebotomos (Diptera, Phlebotominae), vectores de Leishmania sp. no Concelho de Torres Novas, Portugal*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

- Branco, S., Alves-Pires, C., Maia, C., Cortes, S., Cristovão, J. M., Gonçalves, L., Campino, L., Afonso, M. O. 2013. Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, Central Region, Portugal. *Acta Trop*, 125, 339-48.
- Brazil, R. P. & Brazil, B. G. 2003. *Biologia de flebotomíneos do Brasil*, In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro, Fiocruz, 4, 257-74.
- Brazil, R. P., Nascimento, M. D. S. B. & Macau, R. P. 1987. Infecção natural do porco (*Sus scrofa*) por *Leishmania* em foco recente de Leishmaniose Tegumentar na Ilha de São Luís, Maranhão. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 82, 145.
- Calheiros, J. M., Casimiro, E., Almeida, A. P. G. P., Alves-Pires, C., Collares-Pereira, M., Cardoso, M. F., Santos-Siva, M., Afonso, M. O. & Sousa, R. 2006. Saúde Humana e implicações para o turismo. Capítulo 6. In: *Alterações climáticas em Portugal. Cenários, impactes e medidas de adaptação*. Projecto SIAM II. Santos, F. D. & Miranda, P. (editores). Gradiva, Lisboa, Portugal, 237-70.
- Campillo, M.C., Vazquez, F.A.R., Fernandez, A.R.M., Acedo, M.C.S., Rodriguez, S.H., Lopez-Cozar, I.N., Baños, P.D., Romerom H.Q. & Varela, M.C. 1999. *Parasitología Veterinaria*, Madrid, McGraw-Hill Interamericana, 651-65.
- Campino, L., Capela, M.J.R., Maurício, I.L., Ozensoy, S., & Abranches, P. 1995. O Kala-Azar em Portugal. A região do Algarve: Inquérito epidemiológico sobre o reservatório canino no concelho de Loulé. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 18, 189-94.
- Campino, L., Cardoso, L. L., Brito, D. T. V., Carvalho, L. M. & Neves, R. 2009. ONLeish – O Observatório Português das Leishmanioses. Disponível em: <http://www.onleish.org/index.php?article=25&visual=3> [acedido a 1 setembro 2016].
- Campino, L., Cortes, S., Dionísio, L., Neto, L., Afonso, M. O. & Maia, C. 2013. The first detection of *Leishmania major* in naturally infected *Sergentomyia minuta* in Portugal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108, 516-8.

- Campino, L. & Maia, C. 2010. Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. *Acta Med Port.*, 23, 859-64.
- Campino, L., Santos-Gomes, G., Capela, M., Cortes, S. & Abranches, P. 2000. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 92, 269-75.
- Campos, R. A., Arruda, W., Boldo, J. T., Silva, M. V., Barros, N. M., Azevedo, J. L.; Schrank, A. & Vainstein, M. H. 2005. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Current Microbiology*, 50 (4), 257-61.
- Casimiro, E. & Calheiros, J.M., 2002. Human health. In: F.D. Santos, K. Forbes. & R. Moita, ed. *Climate change in Portugal. Scenarios, Impacts and Adaptation Measures-SIAM Project*. Gradiva, Lisbon, 241-300.
- Casimiro, E. Almeida. S. & Gomes, A. 2010. Plano Estratégico de Cascais às alterações climáticas. [Livro Eletrónico] Cascais: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Disponível em: <http://siam.fc.ul.pt/PECAC/pdf/saude-humana.pdf>.
- Casimiro, E., Calheiros, J. M., Santos, F.D. & Kovats, S. 2006. National assessment of Human health effects of climate change in Portugal: approach and key findings. *Environmental Health Perspectives*, 114 (12), 1950-6.
- Ciaramella, P. & Corona, M. 2003. Canine Leishmaniasis: Clinical and Diagnostic Aspects. *Compendiu*, 26, 359-67.
- Claborn, D. M. 2010. The biology and control leishmaniasis vectors. *JGlobInfectDis*, 2, 127-34.
- CML - Câmara Municipal de Lisboa 2012. *Carta de Tipos de Solos de Lisboa*, Lisboa, Câmara Municipal de Lisboa.
- CML - Câmara Municipal de Lisboa 2015. *Biodiversidade na Cidade de Lisboa: uma estratégia para 2020*. [Em linha] Lisboa: Câmara Municipal de Lisboa. Disponível em: <http://www.cm->

lisboa.pt/fileadmin/VIVER/Ambiente/Biodiversidade/Estudos/Biodiversidade.pdf, [acedido 17 Fevereiro 2016].

CML - Câmara Municipal de Lisboa 2016. *Freguesias de Alcântara* [Em linha]. Lisboa: Câmara Municipal de Lisboa. Disponível em: <http://www.cm-lisboa.pt/municipio/juntas-de-freguesia/freguesia-de-Alcântara> [Acedido a 17 Fevereiro 2016].

Colacicco-Mayhugh, M. G., Grieco, J. P. Putnam, J. L., Burkett, D. A., & Coleman, R. E., 2011. Impact of Phlebotomine Sand Flies on United States Military Operations at Tallil Air Base, Iraq: 5. Impact of Weather on Sand Fly Activity. *J. Med. Entomol*, 48 (3), 538-45.

Cortes, S., Maurício, I., Almeida, A., Cristovão, J.M., Pratlong, F., Dedet, J.P. & Campino, L. 2006. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitol Inter*, 55, 277-83.

Cortes, S., Rolão, N., Ramada, J. & Campino, L. 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98, 12-7.

Dantas-Torres, F., Tarallo, V. D. & Otranto, D. 2014. Morphological keys for the identification of Italian phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Parasites & Vectors*, 7, 479.

Dedet, J. P., Vignes, R. V. & Rangel, E. F. 2003. *Morfologia e taxonomia*. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 177-183.

DRE – Diário da República 2012. *Lei nº 56/2012 de 8 de novembro* [Em linha]. Lisboa: Câmara Municipal de Lisboa (CML). Disponível em: http://www.cm-lisboa.pt/fileadmin/DOCS/Reforma_Administrativa_Lisboa/Lei_56_2012.pdf [acedido a 15 agosto 2016].

Dye, C. 1996. The logic of visceral leishmaniasis control. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55, 125-30.

Ejov, M. & Dagne, D. 2014, *Strategic framework for leishmaniasis control in the WHO European Region 2014–2020*. [Livro Eletrónico] Marmorvej: Organização Mundial de Saúde 2014. Disponível em: <http://www.euro.who.int/en/publications/abstracts/strategic-framework-for-leishmaniasis-control-in-the-who-european-region-20142020-2014>, [acedido a 7 setembro 2016].

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2016. *Phlebotomine sand flies* [Em linha]. Sweden: ECDC. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/sanflies/Pages/sandflies.aspx#geo> [acedido a 25 agosto 2016].

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2016. *Phlebotomine maps* [Em linha]. Sweden: ECDC. Disponível em: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/vector-maps/Pages/VBORNET_maps_sandflies.aspx [acedido a 25 agosto 2016].

Ferreira, E. C. 2010. *Estudo dos hospedeiros de Leishmania em área de ocorrência das leishmanioses no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil*. Tese de doutoramento, Centro de Pesquisas René Rachou, Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz.

Ferrolho, J., Maia, C., Gomes, J., Alves-Pires, C., Cristóvão, J. M., Campino, L. & Afonso, M. O. 2015. Rotation of the external genitalia in male Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) in laboratory conditions and in captured specimens in Algarve, Portugal. *Acta Tropica*, 150, 1-3.

França, C. 1913. *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) et fièvre à Pappataci au Portugal. *Bull. Soc. Pathol. Exotique*, 6,123-4.

Gaglio, G., Brianti, E., Napoli, E., Falsonea, L., Dantas-Torres, F., Taraloc, V. D., Otrantoc, D., & Giannetto, G. 2014. Effect of night time-intervals, height of traps and

lunar phases on sand fly collection in a highly endemic area for canine leishmaniasis. *Acta Tropica*, 133, 73-7.

Gebresilassie, A., Yared, S., Aklilu, E., Kirstein, O. D., Moncaz, A., Tekie, H., Balkew, M., Warburg, A., Hailu, A. & Gebre-Michael, T. 2015. The influence of moonlight and lunar periodicity on the efficacy of CDC light trap in sampling *Phlebotomus (Larroussius) orientalis* Parrot, 1936 and other *Phlebotomus* sandflies (Diptera: Psychodidae) in Ethiopia. *Parasite vectors*, 15 (8), 106.

Gouveia, S., Miguel, R., Hernandez, H., Faria, S., Alves-Pires, C., Cristovão, J. M., Maia, C., Campino & Afonso, M. O. 2016. Aspectos bioecológico de flebotomos (Diptera, Psychodidae), vetores de *Leishmania* sp., capturados em 2015, em diferentes áreas endémicas de Portugal. *Livro de Resumos do XVII Congresso Ibérico de Entomologia*, Lisboa, 5-8 setembro, 65.

Grandoni, L. 2013. Epidemiological surveillance of leishmaniasis in the European Union: operational and research challenges [Em linha], 18. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20539> [acedido a 23 de agosto 2016].

Greene, C. E. 2006. Leishmaniasis. Infectious diseases of the dog and cat. *Saunders Elsevier*, 3, 685-98

Helhazar, M. F. 2012. *Avaliação do papel dos roedores das espécies Mus Musculus e Rattus Norvegicus como hospedeiros reservatórios de Leishmania infantum nos Concelhos de Sesimbra e Sintra*, Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.

INE - Instituto Nacional de Estatística 2013. Censos 2011. População residente por freguesia, CAOP 2013 (CSV). Dados populacionais de 2011, recalculados para os limites administrativos da Carta Administrativa Oficial de Portugal (CAOP). *Instituto Nacional de Estatística*.

IPAM - Instituto Português do Mar e da Atmosfera 1971-2000. *Normais Climatológicas* [Em linha]. Lisboa: Instituto Português do Mar e da Atmosfera. Disponível em:

<http://www.ipma.pt/pt/oclima/normais.clima/1971-2000/012/> [Acedido a 25 Fevereiro 2016].

Jiménez, M., González E., Iriso, A., Marco, E., Alegret, A., Fúster, F. & Molina, R. 2013. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol Res*, 112, 2453–9.

Killick-Kendrick, R. 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol*, 17, 279-89.

Kuhn, L., Kasonde, P., Sinkala, M., Kankasa, C., Semrau, K., Vwalika, C., Tsai, W.-Y., Aldrovandi, G. M., & Thea, D. M. 2005. Prolonged breast-feeding and mortality up to two years post-partum among HIV-positive women in Zambia. *AIDS*, 19, 1677-81.

Laison, R. & Sahw, J. J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: The Leishmaniasis. Biology and Medicine. W Peters & R. Killick-Kendrick (Ed.), *Academic Press, London*, 1, 1-120.

Lamourier-Costa, D. & Nery-Costa, C. H. 2014. Leishmaniose Visceral. In: Leishmanioses do Continente. Conceição-Silva, F. & Alves, C. R. *Fiocruz*, 19, 327-53.

Leishrisk, Bridging Research and Leishmaniasis Control 2016. An introduction to neglected diseases and leishmaniasis [Em linha]. Belgium: Institute of Tropical Medicine. Disponível em: <http://www.leishrisk.net/Default.aspx?Menu=MenuMain&MIID=34&WPID=40&L=E> [acedido 29 julho 2016].

Lewis, D. J. 1974. The biology of Phlebotomidae in relation to leishmaniasis. *Annual Review of Entomology*. 19, 363-84.

Lisi, O., D’Urso, V., Vaccalluzzo, V., Bongiorno, G., Khoury, C., Severini, F., Di Muccio, T., Gramiccia, M., Gradoni, L. & Maroli, M. 2014. Persistence of phlebotomine *Leishmania* vectors in urban sites of Catania (Sicily, Italy). *Parasites & Vectors*, 7, 560.

- Macedo, I. T. F., Bevilaqua, C. M. L., Morais, N. B., Souza, L. C., Linhares, F. E., Amóra, S. S. A. & Oliveira, L. M. B. 2008. Sazonalidade de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral no município de Sobral, Ceará, Brasil. *Ciência Animal*, 18, 67-74.
- Maia, C. & Campino, L. 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158, 274-87.
- Maia, C., Afonso, M. O., Neto, L., Dionísio, L. & Campino, L., 2009. Molecular detection of *Leishmania infantum* innaturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve region, Portugal. *J. Vector Borne Dis*, 46, 268-72.
- Maia, C., Coimbra, M., Ramos, C., Cristóvão, J. M., Cardoso, L. & Campino, L., 2015. Serological investigation of *Leishmania infantum*, *Dirofilaria immitis* and *Angiostrongylus vasorum* in dogs from southern Portugal. *Parasites & Vectors*, 8, 152.
- Maia, C., Dionísio, L., Afonso, M. O., Neto, L., Cristóvão, J. M. & Campino, L. 2013. Leishmania infection and host-blood feeding preferences of phlebotomine sandflies and canine leishmaniasis in a endemic European área, the Algarve Region in Portugal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108 (4), 481-7.
- Maia, C., Gomes, J., Cristóvão, J., Nunes, M., Martins, A., Rebêlo, E. & Campino, L. 2010. Feline Leishmania infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Veterinary Parasitology*, 5442, 1-5.
- Maia, C., Nunes, M. & Campino, L. 2008. Importance of cat in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 8 (4), 555-9.
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N. & Gradoni, L. 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27 (2), 123-47.
- Mendonça, J. 2011. *Risco de introdução de novas espécies de Leishmania na região do Algarve*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

- Michalsky, E. M., França-Silva, J. C., Barata, R. A., Lara e Silva, F. O., Loureiro, A. M. F., Fortes-Dias, C. L. & Dias, E. S. 2009. Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (1), 56-61.
- Minodier, P., Piarroux, R., Gambarelli, F., Joblet, C. & Dumon, H. 1997. Rapid identification of causative species in patients with Old World leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 2551-5.
- Monteiro, C. C. 2012. *O papel da microbiota intestinal na competência vetorial do Lutzomyia longipalpis para a Leishmania (Leishmania) infantum chagasi e a transmissão do parasito ao vertebrado pela da picada*. Dissertação de Mestrado. Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz.
- Morales, A., Bello, F. & Cárdenas, E. 2005. Establecimiento, mantenimiento y productividad de una colonia de laboratorio de *Lutzomyia spinicrassa* Morales, Osorno-Mesa, Osorno y Hoyos, 1969 (Diptera: Psychodidae) en Colombia. *Rev Cienc Salud*, 3, 129-35.
- Munstermann, L. E. 2004. Molecular taxonomy and systematics of arthropod vectors. *In: Biology of Disease Vectors*, 2, 505-31.
- Neves, D. P., Melo, A.L., Genaro, O. & Linardi, P. M. 1997. *Parasitologia Humana*. São Paulo, Editora Atheneu.
- Newstead, R. 1911. On a new genus of Psyllidae from Nyasalan. *Bulletin of Entomological Research*, 2, 105-106.
- Núncio, M. S. & Alves, M. J., 2014. *Doenças associadas a artrópodes vetores e roedores*. [livro eletrônico] Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Disponível em: http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/2232/3/Livro_Doencas_associadas_a_artrópodes_vetores_e_roedores.pdf [acedido 11 agosto 2016].
- Oliveira, D. F. 2013. *Identificação Criadouros Naturais de Lutzomyia longipalpis (DIPTERA: PSYCHODIDAE) em área endêmica para a Leishmaniose Visceral, do*

estado da Bahia, Brasil. Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz.

OMS - Organização Mundial de Saúde. 2008. Leishmaniasis. [Em linha]. Disponível em: <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en> [acedido 22 de agosto 2016].

OMS - Organização Mundial de Saúde. 2010. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva. In: *WHO Technical Report Series*, 949, 1-201.

OMS - Organização Mundial de Saúde. 2012. Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis: technical report of the TDR Disease Reference Group on Chagas, In: *WHO Technical Report Series*. 975.

OMS - Organização Mundial de Saúde. 2016. Weekly epidemiological record. [Em linha], 91, 285-96. Disponível em: <http://www.who.int/wer/2016/wer9122.pdf?ua=1> [acedido 1 agosto 2016].

Pais, J., Moniz, C., Cabral, J., Cardoso, J. L., Leoinha, P., Machado, S., Morais, M. A., Lourenço C., Ribeiro, M. L., Henriques, P. & Falé, P. 2006. Carta Geológica de Portugal na escala 1: 50.000. Notícia Explicativa da Folha 34-D. Lisboa. *Serv. Geol. Portugal*, Lisboa, 74.

Parry, M., Pachauri, R., & Canziani, O. 2007. *Climate change 2007 : impacts, adaptation and vulnerability : fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change Working Group II* [Em linha]. Cambridge: Cambridge University Press. Disponível em: <http://www.ipcc.ch/ipccreports/ar4-wg2.htm> [acedido a 27 julho 2016].

Pennisi, M. G. 2004. Case report of leishmaniasis in four cats. *Vet Res Commun*, 28, 363-6.

Pereira, A. R. 2012, Geografia Física e Ambiente. [Em linha] Lisboa: Biblioteca Digital Área Metropolitana de Lisboa (AML). Disponível em: <http://www.aml.pt/biblioteca-digital/publicacoes-n-periodicas/atlas/> [acedido a 1 maio 2016].

- Pereira, M., Afonso, M.O., Machado, M., Sousa, M.C. 2009. Entomological survey of phlebotomine sand flies in a focus of visceral leishmaniasis in a regional centre of Portugal (Coimbra municipality). ESCMID, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Helsinki, Finland, 16-19 May. *Abstract book*, 263.
- Pinto, C. S., Bordalo, A., Albuquerque, M. J., Nascimento, M. L. P. R. & Vicêncio, P. O. 2015. *Doenças de Declaração Obrigatória 2011-2014* [Em linha]. Lisboa: Direção Geral de Saúde. Disponível em: <http://www.dgs.pt/estatisticas-de-saude/estatisticas-de-saude/publicacoes/doencas-de-declaracao-obrigatoria-2011-2014-volume-i2.aspx> [acedido a 12 agosto 2016].
- Pires, C. A. 1984. Les phlébotomes du Portugal I- Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, *Leishmania* dans le foyer zoonotique de Arrábida (Portugal). *Ann. Parasitol. Hum. Comp*, 59 (5), 521-4.
- Pires, C. A., Tang, Y. & Killick-Kendrick, R. 1997. *Didilia* sp. (Tetradonematidae: Mermithoidea: Nematoda) a parasite of *Phlebotomus sergenti* in Portugal. *Parasite*, 2, 191-2.
- Pires, C.A. 2000. *Os flebótomos (Diptera, Psychodidae) dos focos zoonóticos de leishmanioses em Portugal*. Tese de Doutoramento. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, 228 pp.
- Pita-Pereira, D., Alves, C. R., Souza, M. B., Brazil, R. P., Bertho, A. L., Barbosa, A. F. & Brito, C. C. 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99, 905-13.
- Prudhomme, J., Rahola, N., Toty, C., Cassan, C., Roiz, D., Vergnes, B., Thierry, M., Rioux, J. A., Alten, B., Sereno, D. & Bañuls, A. L. 2015. Ecology and spatiotemporal dynamics of sandflies in the Mediterranean Languedoc region (Roquedur area, Gard, France). *Parasites & Vectors*, 8, 642.

- Ready, P. D. 2013. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vector os Disease Agents. *Annu. Rev. Entomol.*, 58, 227-50.
- Ready, P. D. 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill.* 15, 10 [Em linha] disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19505> [acedido 29 agosto 2016].
- Ready, P.D. 2008. Leishmaniasis emergence and climate change. *Rev. Sci. Tech.*, 27, 399-412.
- Reuss S. M. 2013. Review of Equine Cutaneous Leishmaniasis: Not Just a Foreign Animal Disease. In: 59th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. *International Veterinary Information Service*, 256-60.
- Rioux, J. A., Golvan, Y. J., Croset, H., Tour, S., Houin, R., Abonnenc, E., Petitdidier, M., Vollhardt, Y., Dedet, J. P., Albaret, J. L., Lanotte, G. & Quilici, M. 1969. *Epidémiologie des Leishmanioses dans le Sud de la France*, Monographie 37, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, 223 pp.
- Rolão N., Martins, M. J., João, A. & Campino, L. 2005. Equine infection with Leishmania in Portugal. *Parasite*, 12, 183-86.
- Rosypal, A. C., Zajac, A. M. & Lindsay, D. S. 2003. Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, 33, 921-37.
- Sacks, D.L. 2001. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell. Microbiol.*, 3, 189-96.
- Santos, F. D. & Miranda, P. 2006. *Alterações climáticas em Portugal : cenários, impactos e medidas de adaptação: Projecto SIAM II*. Lisboa, Gradiva.
- Santos-de Marco, T., Gaia, M. C. M. & Brazil, E. R. 2002. Influence of the Lunar Cycle on the activity of Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, 18 (2), 114-18.

- Schalling, H. D. & Oskam, L. 2002. Molecular biological applications in the diagnostic and control of Leishmaniasis and parasite identification. *Tropical Medicine International Health*, 7(8), 641- 651.
- Schönian, G., Kuhls, K. & Mauricio, I. L. 2011. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*, *Parasitology*, 138, 405-25.
- Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schalling, H., Presber, W. & Jaffe, C. L. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 47,349-48.
- Semião-Santos, J. S. 1996. *Canine Visceral Leishmaniasis in Évora District, Portugal: A sero-epidemiological study*, Amsterdam, Universiteit Amsterdam, 2, 20.
- Serrada, E. 2010. *A leishmaniose visceral em Portugal continental entre 1999-2009*. Tese de dissertação, Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade Nova de Lisboa, 75-85.
- SGP – Sociedade Geológica de Portugal 1992. *Carta Geológica de Portugal. Lisboa: Serviços Geológicos de Portugal*, Lisboa, Sistema Geográfico de Portugal.
- Sharma, U. & Singh, S. 2008. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis*, 45, 255-72.
- Silva E. S., Gontijo, C. M. F., Pacheco, R. S. & Fiuza, V. O. P., Brazil, R. P. 2001. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96, 285-91.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J. & Ferrer, L. 2007. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal. *Emerg Infect Dis*, 13, 1431-2.
- Souza, A. I. 2005. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Vet Parasitol*, 128, 41-5.

- Spickler, A. R., Galyon, J. & R., James A. 2010. Descriptions of Recent Incursions of Exotic Animal Diseases. *Veterinary Microbiology and Preventive Medicine Publications* [Em linha], 95. Disponível em: <http://www.abc.net.au/health/features/stories/2005/05/19/1836000.htm> [acedido 8 agosto 2016].
- Svobodová, M., Alten, B., Zidková, L., Dvůrák, V., Hlavacková, J., Seblová, V. Kasap, O.E., Belen, A., Votýpka, J. & Volf, P. 2009. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted *Phlebotomus tobbi*. *Int J Parasitol*, 39, 251-6.
- Tabbabi, A., Bousslimi, N., Rhim, A., Aoun, K. & Bouratbine, A. 2011. First report on natural infection of *Phlebotomus sergenti* with *Leishmania* promastigotes in the cutaneous leishmaniasis focus in southeastern Tunisia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85, 646-7.
- Tesh, R. B. 1988. The genus Phlebovirus and its vectors. *Annual Review of Entomology*, 33, 169- 81.
- Vale, V. F. 2008. *Estudo sobre a anatomia, pH e digestão de proteínas no intestino de larvas de Lutzomyia longipalpis (DIPTERA: PSYCHODIDAE)*. [Em linha] Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: <http://www.parasitologia.icb.ufmg.br/defesas/331M.PDF> [acedido a 4 agosto 2016].
- Valença, L. 2015. *Avaliação ultramorfológica de formas imaturas e adultas de Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae) Procedentes do campo e de colônias de laboratório*. [Em linha] Pernambuco: Universidade Federal Rural de Pernambuco. Disponível em: <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede/bitstream/tede2/4702/2/Luiz%20Augusto%20Franca%20Valenca.pdf> [acedido a 4 agosto 2016].
- Watson, R. T., Zinyowera, M. C. & Moss R. H. 1997. *The Regional Impacts of Climate Change: An Assessment of Vulnerability*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Wiley, E. O. 1981. Phylogenetics, The Theory and Practice of Phylogenetic Systematics. *Wiley-Interscience*, 133, 439.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Young, D. G. & Duncan, M. A. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *M Amer Entomol Inst*, 54, 1-881.

6 - ANEXO**FICHA DE CAMPO****Flebótomos (Diptera, Psychodidae)****LOCALIZAÇÃO DA ESTAÇÃO FLEBOTOMÍNICA:**

Distrito de Lisboa

Concelho de Lisboa

Freguesia de Alcântara

Latitude.....38° 42' 33'' N

Longitude.....9° 10' 27'' O

Altitude.....Casa 1 - 38,66 m

Casa 2 - 94,12 m

BIÓTOPO Nº.....**NOME DO COLETOR**.....**DATA E HORAS DE CAPTURA:**

Dia.....

Hora de Colocação.....

Hora de Recolha.....

Duração Total de Captura em Horas.....

MÉTODO DE CAPTURA:☐ a- Armadilha miniaturizada tipo CDC☐ b- Aspirador elétrico manual☐ c- outro.....**ICONOGRAFIA:**☐ Foto nº.....

Biótopo nº.....

TIPO DE FORMAÇÃO SUPERFICIAL:

- ☐ a- solo terroso
 ☐ c- solo argiloso
☐ b- solo arenoso
 ☐ d- outro.....

CARACTERÍSTICAS FITOGEOGRÁFICAS:**Tipo e vegetação predominante**

- ☐ a- fruteiras (citricos)
 ☐ d- relva
☐ b- plantas ornamentais
 ☐ e- palmeiras
☐ c- flores diversas
 ☐ f- outro.....

LOCAL/SÍTIO DE CAPTURA:

- ☐ a- casa 1/tubos/interior.....
☐ b- casa 1/tubos/entrada.....
☐ c- casa 1/churrasqueira/exterior.....
☐ d- casa 2/aviário - aves exóticas/exterior.....
☐ e- outro.....

ANIMAIS EXISTENTES/QUANTIDADE:

- ☐ a- cão/nº.....
☐ b- gato/nº.....
☐ c- aves exóticas/nº.....
☐ d- *Psammodromus hispanicus*/nº.....
☐ e- outro.....

PRESENÇA DE COLEIRAS INSETICIDAS EM CÃES E GATOS:

- ☐ a- cão/nº.....
 ☐ b- gato/nº.....

EXISTÊNCIA DE CÃES VACINADOS CONTRA A LEISHMANIOSE:☐ a- tipo de vacina.....☐ b- cão/nº.....**HUMIDADE:**

Humidade Relativa (com termohigrómetro)..... %

TEMPERATURA:

Ao colocar a armadilha:

☐ termohigrómetro.....°C

Ao retirar a armadilha:

☐ termohigrómetro.....°C**VENTO:**

Ao colocar a armadilha:

☐ velocidade do vento
com anemómetro.....m/s

Ao retirar a armadilha:

☐ velocidade do vento
com anemómetro.....m/s**CHUVA:**

Ao colocar a armadilha:

☐ a- chuviscos
☐ b- chuva forte

Ao retirar a armadilha:

☐ a- chuviscos
☐ b- chuva forte**FASES DA LUA:**☐ a- quarto-crescente
☐ b- quarto-minguante☐ c- lua nova
☐ d- lua cheia**PRESENÇA DE FLEBÓTOMOS NO BIÓTOPO:**☐ a- negativa
☐ b- positiva**OBSERVAÇÕES**.....
.....